

Università degli Studi di Pisa
Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali
Corso di Laurea in Scienze Biologiche

Tesi di Laurea

Insulin- like growth factor I media gli effetti
dell'arricchimento ambientale sul sistema visivo

Candidata

Laura Baroncelli

Relatori

Chiar.mo Prof. Lamberto Maffei

Chiar.ma Prof.ssa Nicoletta Berardi

Anno accademico 2004-2005

A Dino

Riassunto

E' stato recentemente dimostrato che l'arricchimento ambientale influenza profondamente lo sviluppo della corteccia visiva: in particolare, l'arricchimento ambientale dalla nascita determina un'accelerazione della maturazione dell'acuità visiva, tale che i ratti arricchiti raggiungono l'acuità visiva di un ratto adulto già al giorno postnatale 25 (P25).

I fattori che mediano questi effetti dell'arricchimento ambientale non sono ancora noti.

L'arricchimento ambientale determina nell'adulto la produzione di fattori potenzialmente coinvolti nel controllo dello sviluppo e della plasticità della corteccia visiva; fra questi, IGF-I è un candidato particolarmente interessante.

IGF-I attraversa la barriera ematoencefalica e, agendo sui recettori neuronali di IGF-I, incrementa la loro attività elettrica ed induce l'espressione di numerosi fattori importanti per la plasticità neuronale.

Abbiamo esaminato se IGF-I possa essere un mediatore degli effetti dell'arricchimento ambientale sullo sviluppo della corteccia visiva.

Il primo passaggio del nostro studio è stato analizzare con metodi immunoistochimici lo sviluppo dell'espressione di IGF-I nella corteccia visiva di ratti arricchiti dalla nascita ed in ratti di controllo (non arricchiti). Abbiamo scoperto che a P18 i livelli di IGF-I nei ratti arricchiti sono significativamente più alti rispetto a quelli dei ratti non arricchiti.

Abbiamo poi incrementato i livelli di IGF-I nella corteccia visiva di ratti non arricchiti e valutato se questo trattamento accelera lo sviluppo dell'acuità visiva, mimando gli effetti dell'arricchimento ambientale. IGF-I è stato infuso da P18 a P25 in corteccia visiva per mezzo di minipompe osmotiche ed è stata valutata l'acuità visiva elettrofisiologicamente, tramite la misurazione dei potenziali visivi evocati (VEPs).

Abbiamo anche effettuato l'esperimento inverso, bloccando l'azione di IGF-I nella corteccia visiva di ratti arricchiti da P18 a P25, infondendo un antagonista di IGF-I (JB-1), ed abbiamo accertato con i VEPs se questo blocca l'azione dell'ambiente arricchito sullo sviluppo dell'acuità visiva.

Abbiamo trovato che a P25 l'acuità visiva di ratti non arricchiti trattati con IGF-I è più alta di quella dei controlli trattati con salina e simile all'acuità visiva dei ratti arricchiti. Al contrario, l'acuità visiva dei ratti arricchiti trattati con JB-1 è comparabile a quella dei ratti non arricchiti.

Questi risultati suggeriscono che IGF-I possa essere un fattore chiave nel mediare gli effetti dell'arricchimento ambientale sullo sviluppo della corteccia visiva.

Abstract

It has been recently demonstrated that enriched environment strongly affects visual cortex development: in particular, enriched environment from birth causes an accelerated maturation of visual acuity, such that it reaches the acuity of an adult rat already at P25.

The factors mediating these effects of enriched environment are still unknown.

In the adult, enriched environment determines the production of factors potentially able to control visual cortex development and plasticity; among them, a particularly good candidate is insulin like growth factor- 1 (IGF-1).

IGF-1 crosses the blood-brain barrier and, acting on neurons bearing IGF-1 receptors, increases their electrical activity, inducing the production of several factors important for neuronal plasticity.

We investigated whether IGF-1 could be a mediator of enriched environment effects on visual cortex development.

The first step of our study was to analyse immunohistochemically the development of IGF-1 expression in the visual cortex of rats enriched from birth (EE rats) and in control (non EE) rats. We found that at P18 the levels of IGF-1 in EE rats are significantly higher than in control rats.

We then increased IGF-1 in the visual cortex of non EE rats and evaluated whether this accelerated visual acuity development, mimicking enriched environment effects.

IGF-1 was infused from P18 to P25 in the visual cortex by means of osmotic minipumps and visual acuity assessed electrophysiologically with visual evoked potentials (VEPs).

We also performed the reverse experiment, blocking IGF-1 action in the visual cortex of EE rats from P18 to P25 infusing the IGF-1 analogue JB1 and assessed with VEPs whether this blocked enriched environment action on visual acuity development.

We found that visual acuity of P25 non EE rats treated with IGF-1 was higher than

that of saline treated controls and similar to visual acuity of EE rats. By converse, visual acuity of P25 EE rats treated with JB1 was equal to that of non EE rats. These results suggest that IGF-1 could be a key factor mediating enriched environment effects on visual cortex development.

Introduzione

Interazioni geni-ambiente nella regolazione dello sviluppo del sistema nervoso

Il sistema visivo

Le informazioni visive sono elaborate nella retina ed inviate a differenti strutture del sistema nervoso centrale tramite gli assoni delle cellule gangliari, che rappresentano l'output della retina.

Le cellule gangliari hanno proiezioni dirette a molte strutture cerebrali, in particolare al nucleo genicolato laterale dorsale del talamo (dLGN).

Gli assoni delle cellule gangliari di ogni occhio proiettano ad entrambi gli emitalami; tuttavia, all'interno del corpo genicolato le terminazioni non sono mescolate tra loro, ma sono segregate in strati alternati, ognuno dei quali è strettamente monocolare (Hickey e Guillery, 1974). Questa organizzazione stratificata è stata riscontrata nei primati, nel gatto e nel furetto, ma non nei roditori.

Nei roditori le maggiori afferenze del nucleo genicolato laterale derivano dall'occhio controlaterale (infatti, solo il 5-10% degli assoni gangliari proietta ipsilateralmente), ma si può ugualmente distinguere un ristretto corpo di afferenze ipsilaterali; il corpo genicolato dei roditori non è distintamente stratificato, ma le terminazioni retiniche controlaterali ed ipsilaterali sono segregate (Reese e Jeffery, 1983; Reese, 1988).

Il corpo genicolato laterale è la più importante stazione sottocorticale, che trasmette le informazioni visive alla corteccia visiva primaria (V1).

Il principale strato d'ingresso delle fibre talamiche è lo strato IV; l'informazione visiva circola da uno strato corticale all'altro di V1, per poi essere inviata alle aree visive successive o a stazioni sottocorticali.

La corteccia visiva primaria è strutturata in moduli funzionali: i neuroni hanno un'organizzazione colonnare ed interi gruppi di colonne vanno a costituire tali moduli, ciascuno dei quali è deputato ad elaborare le informazioni che provengono da zone specifiche del campo visivo. Sono state identificate le colonne di orientamento (formate da cellule con campi recettivi aventi asse di orientamento pressoché identici), i blob (formazioni cellulari di forma approssimativamente cilindrica localizzate negli strati II e III, i cui neuroni rispondono elettivamente a stimoli colorati) e le colonne di dominanza oculare (disposizioni ordinate di cellule, che ricevono afferenze solo dall'occhio destro o da quello sinistro o da entrambi e rivestono grande importanza per le interazioni binoculari).

Tali sistemi, orientati in senso verticale, comunicano l'un l'altro per mezzo di connessioni orizzontali, che si stabiliscono tra cellule dello stesso strato.

Hubel e Wiesel hanno coniato il termine di *ipercolonna* per designare un intero gruppo di colonne dedicato all'analisi di linee aventi ogni possibile orientamento e provenienti da singole zone dello spazio; ciascun modulo è come una finestra aperta sul campo visivo e all'interno di ogni modulo di elaborazione vengono analizzate tutte le informazioni provenienti da quella porzione del campo visivo. (Kandel et al.,2000)

La principale differenza tra la corteccia visiva dei roditori e quella del gatto e degli altri mammiferi è la mancanza nella prima delle colonne di dominanza oculare. Tuttavia, Thurlow e Cooper (1988) hanno identificato un'organizzazione irregolare delle afferenze ipsilaterali e controlaterali anche nella corteccia visiva dei roditori, tramite tecniche di marcatura anatomica. Recentemente questa osservazione è stata confermata da registrazioni elettrofisiologiche (Caleo et al.,1999).

Sviluppo funzionale della corteccia visiva

La corteccia visiva di molti mammiferi alla nascita è immatura, sia anatomicamente che fisiologicamente, e si sviluppa gradualmente durante le prime settimane di vita postnatale (Hubel e Wiesel,1963a; Blakemore e van Sluyters,1975; Teller et al.,1978; Albus e Wolf,1984; Boothe et al.,1985; Fagiolini et al.,1994; Gordon e Stryker,1996). Durante questo periodo si osserva una sostanziale riorganizzazione anatomica delle connessioni della corteccia visiva, mentre i neuroni sviluppano le loro proprietà funzionali in risposta a stimoli visivi.

Lo sviluppo postnatale funzionale del sistema visivo, ed in particolare della corteccia visiva, è noto ormai da tempo nel gatto e nei primati, mentre è stato definito solo recentemente nei roditori, in particolare nel ratto (Fagiolini et al.,1994).

Studi elettrofisiologici sul sistema visivo del ratto adulto hanno permesso di constatare che i neuroni corticali hanno proprietà funzionali ben definite (Parnavelas et al.,1981; Maffei et al.,1992) e sono distribuiti in differenti classi di dominanza oculare (Maffei et al.,1992; Berardi et al.,1993).

La corteccia visiva del ratto è ancora immatura a P17, tre giorni dopo l'apertura degli occhi (P14) e tutte le proprietà funzionali dei neuroni corticali si sviluppano gradualmente nel mese successivo.

La capacità di risposta dei neuroni della corteccia visiva aumenta consistentemente a partire dalla terza settimana di vita; in particolare, la risposta cellulare, valutata in termini di modulazione dell'ampiezza della scarica in risposta a stimoli visivi, aumenta a partire da P19-P23 fino all'età adulta e da P23 scompaiono la lentezza e la tendenza all'abitudine della risposta (Fagiolini et al.,1994).

Nei ratti P17 quasi tutte le cellule corticali sono binoculari, come negli altri mammiferi (Hubel e Wiesel,1963a); poi i neuroni si distribuiscono nelle classi di dominanza oculare (Fagiolini et al.,1994) e nell'adulto si osserva un'evidente dominanza dell'occhio controlaterale, che riflette l'alta percentuale di decussazione delle fibre del nervo ottico di ratto (90-95%; Polyak,1957); nel gatto e nella scimmia, lo sviluppo funzionale delle colonne di dominanza oculare è correlato con la segregazione anatomica dei terminali del corpo genicolato laterale, mentre un'analoga correlazione non si può osservare nei ratti (Thurlow e Cooper,1988).

La maggior parte delle cellule della corteccia striata non sono selettive per l'orientamento degli stimoli visivi prima di quattro settimane dopo la nascita; la selettività per l'orientamento progredisce gradualmente a partire dall'apertura degli occhi fino a circa sei settimane di età, così come la selettività per la direzione degli stimoli visivi in movimento (Fagiolini et al.,1994).

I lavori sul gatto e sui primati hanno mostrato che nel sistema visivo di questi animali ha luogo un incremento sistematico dell'acuità visiva durante lo sviluppo (Freeman e Marg,1975; Mitchell et al.,1976; Teller et al.,1978). Tali risultati sono stati estesi al sistema visivo del ratto: l'acuità visiva aumenta da 0,51 c/deg a 0,9 c/deg nel primo mese di vita, per poi raggiungere i valori dell'adulto (1-1,2 c/deg) a P40-45. Il pro-

gressivo decremento delle dimensioni dei campi recettivi dei neuroni della corteccia visiva primaria procede in parallelo allo sviluppo dell'acuità visiva: a P17 le dimensioni dei campi recettivi si estendono quasi all'intero emicampo binoculare; a P19-P21 le dimensioni medie dei campi recettivi sono di 34° e diminuiscono ulteriormente durante le settimane successive fino ai valori tipici dell'adulto (Fagiolini et al.,1994). Si può concludere, quindi, che le proprietà funzionali della corteccia visiva del ratto si sviluppano in circa un mese a seguito dell'apertura degli occhi.

Esperienza sensoriale e sistema visivo

E' da tempo assodato che geni ed ambiente operano in concerto nel modellare il sistema nervoso di un individuo ed il suo output funzionale, il comportamento, anche se storicamente la componente genetica e quella ambientale sono state considerate a lungo mutualmente esclusive ed un gran numero di studi si è focalizzato sulla questione del rapporto '*nature versus nurture*' (per una review, vedi Krubitzer e Kahn,2003).

Il ruolo dell'esperienza sensoriale nella formazione dei circuiti neurali è stato studiato approfonditamente nel sistema visivo dei mammiferi e lo studio di questo modello ha contribuito alla comprensione dell'importanza dell'input ambientale per la maturazione del sistema nervoso centrale.

L'importanza degli effetti dell'esperienza sensoriale sullo sviluppo del sistema nervoso è emersa per la prima volta con lo studio di pazienti affetti da cataratta congenita: se la rimozione della cataratta viene eseguita dopo i 10 anni di vita, i soggetti non recuperano la capacità di percepire le forme degli oggetti; attualmente, in parte per i risultati di queste ricerche, la cataratta congenita viene rimossa usualmente durante la primissima infanzia (Maurer et al.,1983).

A livello neurobiologico, la maggior parte delle informazioni riguardo al ruolo dell'esperienza nella maturazione dei circuiti corticali sono derivate dallo studio dello sviluppo delle colonne di dominanza oculare nella corteccia visiva dei mammiferi.

Secondo la visione classica, le colonne di dominanza oculare sono assenti nelle fasi precoci dello sviluppo (Rakic,1977; LeVay et al.,1980; Shatz,1990) e le fibre talamo-corticali si sovrappongono per ampi tratti nello strato IV della corteccia; successivamente, riarrangiamenti anatomici degli assoni presinaptici (Antonini e Stryker,1993) sono accompagnati funzionalmente da una corrispondente modificazione della fisiolo-

gia sinaptica dei neuroni dello strato IV (LeVay et al.,1978).

La dimostrazione dell'importanza del ruolo dell'esperienza visiva per la formazione e l'organizzazione delle colonne di dominanza oculare è stata fornita dai classici esperimenti di Hubel e Wiesel (Hubel e Wiesel,1963b; Hubel e Wiesel,1970; Hubel et al.,1977): se un occhio viene privato della visione, tramite sutura delle palpebre (protocollo al quale ci si riferisce comunemente con il termine di *deprivazione monoculare*), la maggior parte dei neuroni visivi corticali diventano responsivi solo agli stimoli presentati all'occhio rimasto aperto e si osserva un'alterazione anatomica delle colonne di dominanza oculare (Shatz,1990), in parallelo ad una consistente compromissione dell'acuità visiva dell'occhio privato, nota come ambliopia (Odom,1983).

Recentemente, tuttavia, è stato suggerito che lo sviluppo delle colonne di dominanza oculare implichi due fasi: una prima fase di formazione, che viene controllata da programmi molecolari controllati geneticamente ed indipendenti dall'esperienza ed una seconda fase di maturazione e plasticità, che viene influenzata dalle caratteristiche dell'attività nervosa ritrasmessa dalle afferenze sensoriali (per una review, vedi Crowley e Katz,2002; Katz e Crowley,2002).

Il modello delle colonne di dominanza oculare rimane un esempio paradigmatico di come geni ed ambiente interagiscono nella regolazione dello sviluppo del sistema nervoso: infatti, una volta formati sulla base di una guida essenzialmente basata su specificazioni genetiche, fra cui possiamo includere anche l'attività spontanea presente in utero nelle diverse stazioni visive (Maffei e Galli-Resta,1990; Meister et al.,1991; Crair,1999; Weliky,2000), i circuiti neurali vengono affinati da interazioni tra l'organismo e l'ambiente.

Un altro protocollo sperimentale, che ha fornito ulteriore sostegno a questo concetto, è quello del *dark-rearing*: è stato osservato, infatti, che la corteccia visiva di gatti e ratti allevati al buio permane fino all'età adulta in uno stato di immaturità, con la grande maggioranza delle cellule corticali, che, pur rispondendo agli stimoli visivi, non mostrano selettività per l'orientamento e sono in gran parte binoculari; inoltre, la risposta delle cellule è debole e va incontro rapidamente ad abitudine, i campi recettivi delle cellule sono più grandi e l'acuità visiva è più bassa (Cynader e Mitchell,1980; Mower,1991; Fagiolini et al.,1994).

Periodi critici dello sviluppo

Hubel e Wiesel sono stati i primi ad introdurre l'idea dell'esistenza di un periodo critico, durante il quale l'ambiente può influenzare la maturazione del sistema visivo: gli effetti della deprivazione monoculare, infatti, sono ristretti ad una fase precoce dello sviluppo dell'animale.

Tuttavia, il concetto di periodo critico non è confinato allo studio dello sviluppo del sistema visivo.

Durante il primo periodo di vita l'esperienza forma indelebilmente molti aspetti del comportamento. Molti animali, per esempio, imparano a riconoscere gli ambienti ai quali torneranno ad anni di distanza per deporre le uova, gli uccelli canori apprendono dai genitori il loro canto ed il bambino acquisisce quella sofisticata forma di comunicazione distintiva dell'essere umano, che è il linguaggio. Alla base di questi fenomeni è la plasticità neurale, ossia la capacità dei circuiti cerebrali di modificarsi in modo adattativo all'ambiente. La plasticità del cervello ha il suo apice nelle prime fasi dello sviluppo postnatale, in cui sono possibili grandiosi riassetamenti dei circuiti cerebrocorticali (Buonomano e Merzenich, 1998).

Si definisce *periodo critico* per lo sviluppo di una funzione una definita porzione della vita di un animale dedicata al rimodellamento delle connessioni neurali, alla base della suddetta funzione. La durata del periodo critico, per ogni funzione studiata, varia in relazione alla lunghezza della vita dell'animale ed alla complessità del suo sistema nervoso (Berardi et al., 2000).

Negli ultimi 40 anni, sono stati compiuti grandi sforzi nel tentativo di delucidare i meccanismi cellulari e molecolari alla base delle risposte plastiche del sistema visivo all'esperienza sensoriale durante il periodo critico e della chiusura di questo tipo di plasticità nell'organismo adulto.

Sebbene la conoscenza di questi processi sia ancora deficitaria, una vasta gamma di risultati interessanti sono stati accumulati con il passare degli anni (per una review, vedi Berardi et al., 2000; Berardi et al., 2003).

Influenza dell'ambiente sul sistema nervoso ed il comportamento: l'arricchimento ambientale

Un ampio corpo di studi ha posto in rilievo l'importanza dell'esperienza sensoriale nel raffinamento e mantenimento delle appropriate connessioni neurali.

Come abbiamo visto, l'approccio più diretto per investigare l'influenza dell'esperienza sul sistema nervoso è quello di manipolare il pattern di stimolazione ambientale a cui gli animali vengono esposti.

In questo contesto, in parallelo agli esperimenti di Hubel e Wiesel sulla deprivazione monoculare, un importante contributo è stato offerto dagli esperimenti di Rosenzweig e colleghi.

Questi autori hanno introdotto l'arricchimento ambientale come protocollo sperimentale votato all'analisi dell'influenza dell'ambiente sul sistema nervoso, mostrando che la morfologia, la biochimica e la fisiologia del cervello possono essere alterate da una modificazione della qualità e dell'intensità della stimolazione ambientale (Rosenzweig, 1966; Rosenzweig e Bennett, 1969).

Da allora molti studi hanno sfruttato come paradigma sperimentale l'arricchimento ambientale.

Arricchimento ambientale: definizione e peculiarità del protocollo sperimentale

L'arricchimento ambientale è stato definito per la prima volta da Rosenzweig et al. (1978) come *'a combination of complex inanimate and social stimulation'*.

Gli animali arricchiti sono allevati in gruppi di numerosi individui (8-12 individui può essere considerata la condizione più comune) ed in gabbie di grandi dimensioni, accessoriate con giochi, tunnels, scale, piattaforme, scatole, ruote e materiali diversi per il nido. Gli oggetti presenti nelle gabbie di arricchimento sono sostituiti con altri, o almeno ne viene variata la posizione, una volta al giorno; allo stesso modo viene frequentemente cambiata l'ubicazione di acqua e cibo.

La definizione riportata di arricchimento ambientale si basa sulla comparazione delle condizioni dell'ambiente arricchito con le alternative condizioni di allevamento, che sono frequentemente usate in laboratorio: la condizione standard, nella quale ani-

mali sono allevati in gruppi di 3 – 5 individui in gabbie di piccole dimensioni, in cui non sono presenti particolari oggetti, al di là di materiale per il nido, e cibo ed acqua ad libitum; e la condizione detta di impoverimento, in cui un animale è allevato da solo in una gabbia identica, per dimensioni ed accessoriamiento, a quelle dell'allevamento standard (Figura 1.1).

L'ambiente creato nelle condizioni di arricchimento stimola gli animali a vari livelli: permette loro di effettuare attività fisica volontaria, fornisce una continua stimolazione multi-sensoriale, risveglia le loro tendenze esplorative e suscita la loro curiosità ogni volta che gli oggetti della gabbia vengono cambiati e/o spostati, aumenta le relazioni sociali di ogni singolo animale.

Molti studi hanno tentato di identificare i differenti contributi di queste diverse componenti, ma la visione predominante è che non c'è un singolo fattore, a cui poter attribuire gli effetti dell'arricchimento ambientale (van Praag et al., 2000). In particolare, è stato stabilito che è essenziale un'interazione diretta con l'ambiente arricchito (i cosiddetti TV rats, a cui è data la possibilità di osservare, ma non di sperimentare l'ambiente arricchito, non sono arricchiti, Ferchmin e Bennett, 1975) e che la sola componente di incrementata socialità non è sufficiente per rendere conto di tutti gli effetti dell'arricchimento (Rosenzweig et al., 1978).

E' interessante notare, tuttavia, che le singole componenti, incluse nelle condizioni di arricchimento, possono agire in maniera additiva, come suggerito da studi morfologici, dai quali risulta che la densità sinaptica, il numero di sinapsi per neurone e la lunghezza massima delle zone di contatto sinaptico sono maggiori negli animali arricchiti, intermedi nei ratti allevati in gruppi numerosi e più bassi in animali isolati (Turner e Greenough, 1985; Sirevaag e Greenough, 1985).

La maggior parte degli effetti osservati negli animali arricchiti sono simili a quelli riscontrati in animali sottoposti ad intenso esercizio fisico (per una review, vedi Cotman e Berchtold, 2002). L'attività fisica migliora le funzioni cognitive (Fordyce e Farrar, 1991; Kramer et al. 1999; Churchill et al., 2002), incrementa la neurogenesi (van Praag et al., 1999 a, b) ed è neuroprotettiva, dal momento che determina miglioramenti dei danni neurologici di differenti patologie neurodegenerative (Arkin, 1999; Petajan e White, 1999; Larsen et al., 2000; Mattson, 2000; Carro et al. 2000, 2001); inoltre, l'esercizio fisico incrementa l'angiogenesi (Black et al. 1990; Isaacs et al., 1992) ed aumenta i livelli cerebrali di neurotrofine (Neeper et al., 1996; Oliff et

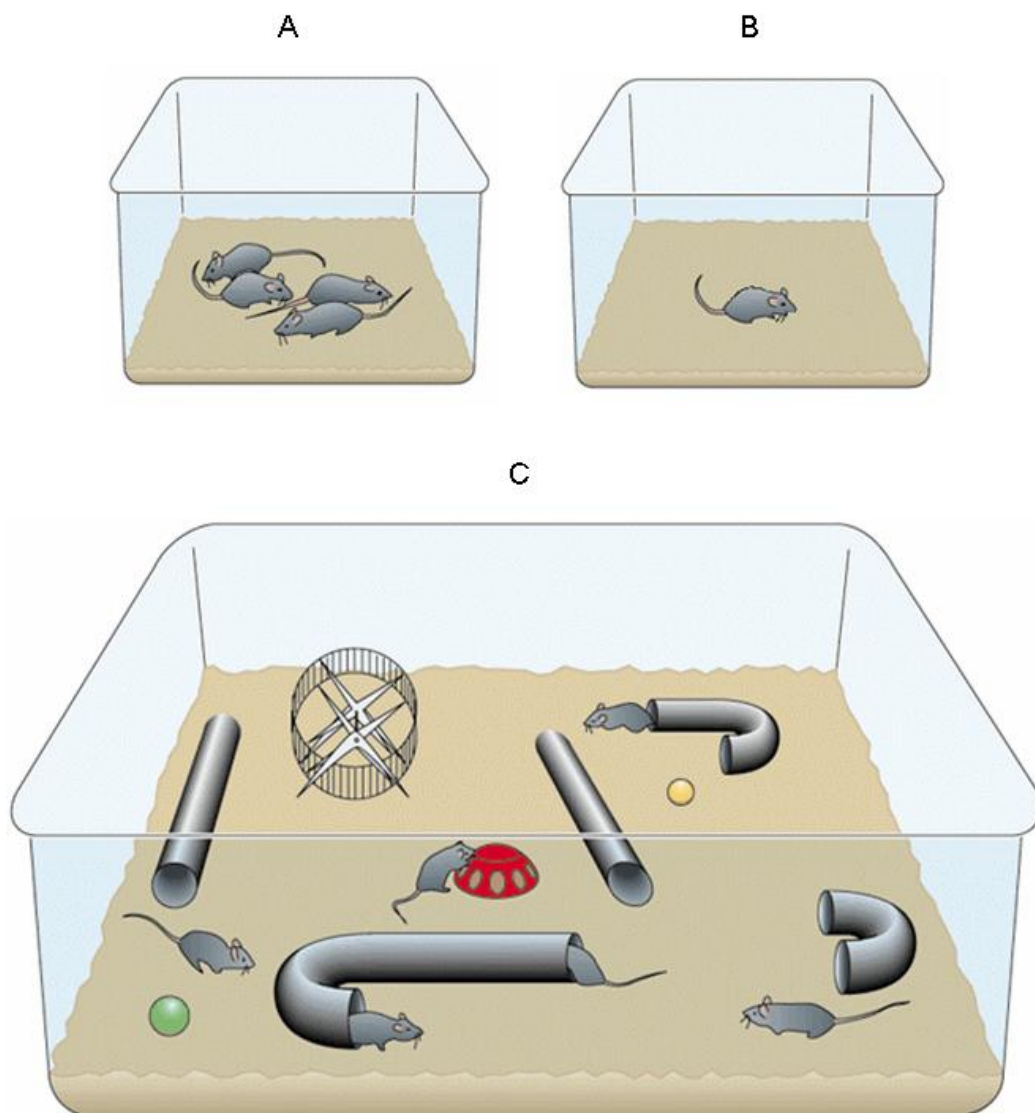


Figura 1: Differenti condizioni di allevamento: A. Condizioni standard: gli animali sono alloggiati in piccoli gruppi in gabbie di dimensioni standard senza nessun oggetto; B. Condizioni di impoverimento: gli animali sono alloggiati individualmente in gabbie analoghe a quelle dell'allevamento standard; C. Condizioni di arricchimento: l'arricchimento ambientale promuove l'interazione sociale (numerosi animali in ogni gabbia), stimola l'attività motoria, il comportamento esplorativo e le capacità cognitive degli animali.

al., 1998; Carro et al., 2000; Johnson et al., 2003; Farmer et al. 2004; Klintsova et al., 2004).

Dato che tutti questi effetti sono presenti anche negli animali allevati in condizioni di arricchimento ambientale, è possibile che una sostenuta attività fisica e l'arricchimento ambientale condividano pathways comuni di eventi cellulari e molecolari: questo rende ancora più difficoltoso chiarire quali siano i contributi relativi di ogni componente che caratterizza l'ambiente arricchito.

Considerando che l'ambiente arricchito è un paradigma sperimentale ampiamente sfruttato per analizzare l'influenza della stimolazione ambientale sul sistema nervoso, è interessante confrontarlo con un altro trattamento sperimentale introdotto nello stesso periodo storico per investigare lo stesso tipo di problemi, la deprivazione mon oculare (Rosenzweig e Bennett, 1996). La deprivazione mon oculare è un trattamento piuttosto drastico, che è efficace solo durante un ben definito periodo critico dello sviluppo precoce e che è focalizzato sull'analisi del ruolo di un'alterata esperienza sensoriale sullo sviluppo e la plasticità di specifici canali sensoriali. In contrasto, l'arricchimento ambientale è un trattamento naturale, che ha rivelato esercitare i propri effetti a tutte le età analizzate e che è particolarmente adeguato per analizzare modificazioni dell'intero organismo.

Dal momento che l'arricchimento ambientale fornisce l'opportunità di svolgere studi sull'ottimizzazione, piuttosto che sull'alterazione o sulla riduzione dell'esperienza sensoriale, e poichè lo stesso è in grado di influenzare l'output funzionale del sistema nervoso, ovvero il comportamento, i risultati ottenuti in questo campo sono di grande interesse ed applicabilità anche per l'uomo in campi diversi, dalla psicologia alla clinica medica.

Nei paragrafi successivi passeremo in rassegna i risultati ottenuti dagli studi sull'arricchimento ambientale: è stato evidenziato che questo protocollo sperimentale può causare modificazioni funzionali, anatomiche e molecolari a livello del sistema nervoso (per una review vedi Rosenzweig e Bennett, 1996; van Praag et al., 2000).

Arricchimento ambientale e performances comportamentali

Nel 1947 Hebb notò che alcuni ratti, che aveva portato a casa per alcune settimane, come animali domestici per i suoi figli, e poi riportati in laboratorio, esibivano

prestazioni migliori in molti tests comportamentali rispetto ai ratti che erano rimasti in laboratorio (Hebb, 1949).

A partire da questa osservazione aneddotica si sono susseguiti un gran numero di studi, che hanno evidenziato come l'esperienza di un ambiente complesso possa indurre il miglioramento delle performances degli animali in compiti che coinvolgono funzioni cognitive superiori, in particolar modo apprendimento e memoria (per una review, Rampon e Tsien, 2000).

Uno degli effetti più robusti sul comportamento di topi e ratti si riscontra in compiti, dipendenti dall'ippocampo, che coinvolgono la memoria spaziale, come il Morris water maze (D'Hooge e De Deyn, 2001). L'arricchimento ambientale migliora l'apprendimento e la memoria spaziale nel Morris water maze (questo è stato dimostrato in molti studi, e.g. Moser et al., 1994; Kempermann et al., 1997; Nilsson et al., 1999; Tees, 1999; Rampon et al., 2000a; Tang et al., 2001, Williams et al., 2001). Inoltre, è stato osservato che l'arricchimento ambientale allevia il declino cognitivo della memoria spaziale, tipicamente associato con l'avanzare dell'età (per una review, vedi Winocour, 1998). Questo ultimo effetto è stato collegato con generali segni di 'salute cellulare' a livello dell'ippocampo, come aumentati livelli di sinaptofisina (Saito et al. 1994; Frick e Fernandez, 2003), una glicoproteina di membrana delle vescicole presinaptiche, e ridotti depositi di lipofusina (Kempermann et al., 2002), che sono indicatori di stress ossidativo cronico, ed una pronunciata induzione della neurogenesi ippocampale (Kempermann et al., 2002).

L'ipotesi che l'incremento di neuroni di nuova generazione, promosso dall'arricchimento ambientale, sia direttamente responsabile del parallelo miglioramento delle performances comportamentali in compiti dipendenti dall'ippocampo è stata confermata da recenti risultati, che hanno mostrato come un trattamento antimitotico, che riduce la neurogenesi indotta dall'arricchimento ambientale, prevenga completamente il miglioramento della memoria a lungo termine (Jungerman et al., 2005). Maggiore incertezza sussiste riguardo ai meccanismi cellulari che sono alla base del miglioramento delle performances comportamentali osservato negli animali arricchiti, ma un incremento nel potenziamento a lungo termine nell'ippocampo (LTP), modello universalmente accettato di memoria cellulare e modificazione attività- dipendente dell'efficacia sinaptica, è stato osservato in animali allevati in un ambiente arricchito (van Praag et al., 1999a; Duffy et al., 2001), insieme ad un incremento dei livelli di

trasmissione (Green e Greenough, 1986) e di forza sinaptica (Foster et al., 1996).

Questi risultati mettono in luce l'impatto che l'influenza ambientale ha sulle capacità cognitive, mostrando che un'adeguata stimolazione ambientale può migliorare le funzioni cerebrali anche in età avanzata, quando è normalmente osservato un declino delle facoltà di apprendimento e memoria.

Gli effetti indotti dall'arricchimento ambientale su apprendimento e memoria non sono limitati al contesto della memoria di natura spaziale, come mostrato in dettaglio nella sistematica analisi comportamentale condotta da Rampon et al. (2000a), in cui si evidenzia come l'ambiente arricchito migliori le performances mnemoniche in tre differenti compiti di natura non-spaziale. In particolare, l'arricchimento incrementa la memoria di riconoscimento visivo nel test del novel object recognition e la memoria di associazione nel test di contextual fear-conditioning e nel test di cued fear-conditioning.

Considerando l'impatto generale della stimolazione ambientale sul comportamento, uno speciale interesse meritano gli studi relativi all'influenza dell'ambiente arricchito sulle reazioni emozionali e sullo stress, date le ben documentate relazioni che intercorrono tra i livelli di stress e le funzioni cognitive (Isgor et al., 2004; Sandi, 2004; Lupien et al., 2005). La questione sulla possibile capacità dell'ambiente arricchito di abbassare i livelli di stress è rimasta a lungo controversa, e studi che riportavano che animali arricchiti esibivano livelli di stress e di ansia inferiori al normale (Roy et al., 2001; Larsson et al., 2002; Moncek et al., 2004) hanno trovato paralleli contraddittori in studi tesi ad analizzare i parametri chimici dello stress, come differenze nei livelli di corticosterone tra animali arricchiti ed impoveriti, in un primo tempo negate (Pham et al., 1999), poi successivamente riaffermate (Belz et al., 2003).

Tuttavia, risultati ottenuti in topi BALB/c (linea di topi ansiosi) sembrano supportare un effetto ansiolitico dell'ambiente arricchito (Trullas e Skolnick, 1993; Chapillon et al., 1999). Inoltre, alcuni recenti esperimenti hanno messo in luce che l'allevamento in ambiente arricchito è in grado di abolire l'elevazione dei livelli di cortisone in risposta ad un protocollo di stress indotto, basato sulla somministrazione all'animale di un debole shock elettrico (Benaroya-Milshtein et al., 2004).

Arricchimento ambientale ed anatomia del sistema nervoso

L'accertato miglioramento delle prestazioni in tests comportamentali di apprendimento e memoria suggerisce che in animali esposti ad un ambiente arricchito i circuiti cerebrali vengano riorganizzati, al fine di ottimizzare il processamento e l'immagazzinamento di livelli multipli di informazione.

Gli esperimenti pionieristici di Rosenzweig et al. (1962) hanno mostrato che i miglioramenti delle performances comportamentali osservati negli animali arricchiti sono accompagnati da modificazioni anatomiche del sistema nervoso. Tali modificazioni includono un incremento del peso e dello spessore corticale (Diamond et al., 1964; 1972) e delle dimensioni dei corpi cellulari e dei nuclei dei neuroni corticali (Diamond, 1967). Inoltre, negli anni successivi, molti gruppi hanno evidenziato che l'esposizione degli animali ad un ambiente arricchito determina modificazioni strutturali anche a carico dei dendriti: Holloway (1966) è stato il primo a riportare che i ratti arricchiti presentano una maggiore ramificazione dell'albero dendritico dei neuroni stellati dello strato II della corteccia visiva; è stato poi scoperto che anche ratti esposti a condizioni di arricchimento per soli 30 giorni esibiscono un aumento dell'arborizzazione dendritica nelle cellule piramidali degli strati II, IV e V della corteccia occipitale (Greenough e Volkmar, 1973); inoltre, sono stati descritti nella corteccia occipitale di animali arricchiti un aumento della lunghezza dei dendriti e del loro campo di arborizzazione (Ulyings et al., 1978; Juraska et al., 1980; Green et al., 1983) ed un incremento del 10% nel numero di spine sinaptiche per unità di lunghezza dei dendriti basali (Globus et al., 1973).

Nel tentativo di caratterizzare meglio la durata di esposizione all'arricchimento ambientale necessaria per provocare modificazioni anatomiche misurabili nel sistema nervoso, è stato osservato che, mentre un giorno di arricchimento è insufficiente, 4 giorni consecutivi sono in grado di incrementare lo spessore corticale nelle aree di associazione visiva (Diamond, 1988); similmente, 4 giorni di arricchimento sono sufficienti per incrementare la lunghezza totale dei dendriti e le loro ramificazioni nella corteccia visiva primaria (Wallace et al., 1992). Le modificazioni strutturali provocate nella corteccia occipitale da un lungo periodo di arricchimento sono a lungo termine e persistono anche dopo 30 giorni di isolamento in gabbie standard (Camel et al., 1986).

Un'altra struttura molto sensibile all'arricchimento ambientale è l'ippocampo, dove modificazioni simili a quelle riportate per la corteccia cerebrale sono state riscontrate nelle cellule piramidali delle aree CA1 e CA3 e del giro dentato (Walsh et al., 1969; Walsh e Cummins, 1979; Rosenzweig e Bennett, 1996; Rampon et al., 2000a). Anche lo striato (Comery et al., 1995) e il cervelletto (Floeter e Greenough, 1979) sono influenzati dall'arricchimento ambientale.

Questi risultati hanno condotto alla concezione, secondo la quale alcune specifiche aree cerebrali, in particolare la corteccia visiva e l'ippocampo, sono più sensibili di altre all'attivazione dipendente dall'esperienza (la corteccia somatoestesica è quella in cui si osservano, invece, le trasformazioni di minor conto) e l'arricchimento ambientale è in grado di interferire con le strutture neurali senza causare una crescita indifferenziata della massa cerebrale.

Le modificazioni della lunghezza dei dendriti, delle ramificazioni e del numero delle spine suggeriscono che la stimolazione ambientale abbia un profondo impatto sull'apparato sinaptico, dal momento che il 90% delle sinapsi eccitatorie risiedono sulle spine dendritiche (Harris e Kater, 1994). Quindi, è molto probabile che un incremento nel numero delle spine dendritiche possa riflettere un incremento del numero delle sinapsi.

Usando tecniche di microscopia elettronica, molti gruppi hanno riportato, infatti, cambiamenti della densità sinaptica nella corteccia visiva di animali arricchiti, quali un incremento delle aree di contatto sinaptico (West e Greenough, 1972) ed un aumento del numero di sinapsi per neurone (Mollgaard et al., 1971; West e Greenough, 1972; Diamond et al., 1975; Greenough et al., 1978; Beaulieu e Colonnier, 1987; Turner e Greenough, 1985). Un incremento della densità sinaptica nei ratti arricchiti è stata osservata anche nella regione CA3 dell'ippocampo da Altschuler (1979) e nella regione CA1 da Rampon et al. (2000a)

Gli studi sull'arricchimento ambientale hanno guadagnato maggiore interesse con la caduta del dogma, che postulava l'incapacità del sistema nervoso maturo di generare nuovi neuroni. Sebbene nei roditori la maggior parte dei neuroni venga generata alla nascita dell'animale, alcune strutture cerebrali, di cui esempi paradigmatici sono il bulbo olfattivo ed il giro dentato dell'ippocampo, mantengono potenzialità neurogenetiche anche dopo la maturità sessuale dell'animale (Gueneau et al., 1982; Kuhn et al., 1996); questa proprietà è stata dimostrata anche per le scimmie (Gould et al.,

1999) e per l'uomo (Eriksson et al., 1998).

Studi recenti hanno evidenziato che l'esposizione all'ambiente arricchito determina un significativo incremento della neurogenesi ippocampale (Kempermann et al., 1997). Un effetto simile è indotto dall'esercizio fisico (van Praag et al., 1999 a, b), ma le due condizioni sembrano agire tramite meccanismi distinti: mentre l'esercizio fisico stimola la neurogenesi con un incremento sia nella proliferazione dei precursori neuronali sia nella sopravvivenza dei neuroni di nuova generazione, l'esposizione ad un ambiente arricchito è in grado di incrementare solo la sopravvivenza dei neuroni (van Praag et al., 1999b). L'esercizio fisico probabilmente non è sufficientemente incrementato nelle condizioni di arricchimento per suscitare gli stessi effetti.

La capacità dell'ambiente arricchito di interagire con i programmi di rinnovamento delle cellule nervose si estende al di là di un'influenza sulla neurogenesi, dal momento che include anche la riduzione della morte cellulare apoptotica nell'ippocampo di ratto sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Young et al., 1999).

Questi risultati rivelano un inaspettato ed elevato grado di plasticità strutturale del cervello adulto, indotto dalla stimolazione ambientale.

Arricchimento ambientale e meccanismi molecolari

Gli studi tesi a comprendere i possibili meccanismi molecolari, alla base delle modificazioni osservate a livello anatomico e comportamentale negli animali arricchiti, sono iniziati molti anni fa, dettati dall'interesse sollevato dalla possibilità di identificare molecole, che possano essere manipolate per riprodurre gli effetti positivi dell'ambiente arricchito.

I primi studi di Rosenzweig et al. (1962, 1967) hanno riportato un incremento dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi nel cervello degli animali arricchiti e gli studi successivi hanno confermato questi risultati, estendendo questa iniziale osservazione ad altri sistemi di neurotrasmettitori, come la serotonina (Rasmuson et al., 1998) e la noradrenalina (Escorihuela et al., 1995; Naka et al., 2002). Tutti questi neurotrasmettitori influenzano l'apprendimento e la plasticità del cervello adulto (van Praag et al., 2000), ma regolano anche l'arousal (Berridge e Waterhouse, 2003), per cui il loro coinvolgimento come mediatori molecolari dell'arricchimento ambientale non aiuta a delucidare la natura effettiva dell'influenza dell'arricchimento. In particolare, questi

studi hanno lasciato aperta la diatriba tra l'ipotesi 'learning and memory', secondo la quale le modificazioni morfologiche, indotte dall'arricchimento ambientale, sono mediate dai meccanismi cellulari dei processi di apprendimento, e l'ipotesi 'arousal', che sostiene, invece, che gli effetti dell'arricchimento ambientale sono dipendenti da un aumento dei livelli di vigilanza dell'animale (van Praag et al., 2000).

Un gruppo di molecole particolarmente sensibile agli stimoli ambientali, che esercita potenti effetti sul sistema nervoso è costituito dai fattori neurotrofici (o neurotrofine), una classe di proteine secrete, che promuovono lo sviluppo e la sopravvivenza neuronale (NGF, BDNF, NT-3, NT-4). I fattori neurotrofici sono fortemente implicati nella regolazione dei riarrangiamenti strutturali e funzionali, che seguono la stimolazione sensoriale sia durante lo sviluppo che durante i processi di plasticità (Bonhoeffer, 1996; Cellerino e Maffei, 1996; Berardi e Maffei, 1999; Thoenen, 2000).

Uno degli effetti dell'arricchimento ambientale sul sistema nervoso a livello molecolare caratterizzati meglio è l'induzione dell'espressione dei fattori neurotrofici (per una review Pham et al., 2002), una scoperta rilevante in funzione della comprensione dei meccanismi che sono alla base della risposta all'ambiente arricchito a livello di plasticità neurale e comportamentale.

L'arricchimento ambientale determina un aumento dei livelli di mRNA di NT-3 e NGF in corteccia ed ippocampo (Torasdotter et al., 1996; Torasdotter et al. 1998), un incremento dell'mRNA di NGFI-A o Zif/268 (Pinaud et al., 2002) ed un incremento dei livelli proteici di NGF, BDNF e NT-3 (Ickes et al., 2000; Pham et al., 1999b; Pham et al., 2002) in diverse regioni cerebrali del ratto.

Inoltre, l'arricchimento ambientale stimola la fosforilazione del fattore di trascrizione CREB nell'ippocampo (Young et al., 1999; Gomez-Pinilla et al., 2002), che è noto regolare l'espressione di BDNF (Tao et al., 1998). E' interessante notare anche che l'aumento dei livelli di neurotrofine, prodotto dall'arricchimento ambientale, non sembra essere soggetto ad abitudine, dal momento che, dopo 12 mesi di arricchimento, i livelli di NGF, BDNF e NT-3 sono maggiori nella maggior parte delle aree cerebrali dei ratti arricchiti rispetto a quelli degli animali allevati in condizioni standard (Ickes et al., 2000). I sostenuti livelli di attività fisica, associati all'ambiente arricchito, possono aumentare anche l'assorbimento cerebrale di altri fattori trofici fisiologicamente importanti, come l'insulin-like growth factor I (Carro et al., 2000).

Nuove possibilità di analisi delle modificazioni molecolari provocate dalla stimolazione

ambientale derivano dal recente sviluppo di tecniche di gene chip analysis, che permettono lo screening simultaneo e la comparazione di un'attivazione genica differenziale in relazione a diverse condizioni ambientali.

Gli studi che hanno analizzato gli effetti dell'arricchimento sull'espressione genica nel topo (Rampon et al., 2000b) e nel ratto (Keyvani et al., 2004) hanno riportato modificazioni che si verificano anche dopo solo 3 ore di esposizione all'ambiente arricchito, ma che persistono fino a due settimane dall'inizio della procedura di arricchimento. E' stato osservato che un gran numero di geni varia i propri livelli di espressione in risposta all'ambiente arricchito e la maggior parte di essi possono essere raggruppati in classi funzionali di geni, legati al mantenimento della struttura neuronale, alla plasticità ed alla trasmissione sinaptica, all'eccitabilità neuronale, alla neuroprotezione, alle capacità di apprendimento e memoria.

L'avvento delle tecniche di knockout genico condizionale hanno offerto un potente strumento per fare luce sui mediatori molecolari, che sono alla base degli effetti dell'arricchimento ambientale sul sistema nervoso.

Importanti risultati in questo senso sono stati ottenuti da Rampon et al. (2000a), che hanno analizzato l'influenza dell'arricchimento ambientale su topi knockout, in cui il recettore NMDA è selettivamente deleto nella regione CA1 dell'ippocampo. I profondi deficits di apprendimento, che esibiscono questi animali in tre diversi test comportamentali dipendenti dall'ippocampo, sono recuperati dopo due mesi di arricchimento (Rampon et al., 2000a). Tentativi di identificare i meccanismi coinvolti in questa compensazione comportamentale hanno rivelato che l'arricchimento incrementa selettivamente la densità ippocampale delle sinapsi non perforate. Un'altra interpretazione proposta da Tsien e colleghi (Rampon et al., 2000a) è che la compensazione data dall'arricchimento possa essere dovuta ad un aumento delle connessioni esterne a quelle funzionalmente delete nell'ippocampo, per esempio a livello della corteccia.

Questa possibilità è supportata da un altro studio condotto dallo stesso gruppo, in cui le funzioni di apprendimento e memoria sono state analizzate in topi transgenici, nei quali la funzione del recettore NMDA è aumentata nel proencefalo tramite la sovraespressione della subunità NR2B (Tang et al., 2001). Questi topi esibiscono capacità di apprendimento e memoria superiori al normale nei tests di cued fear-conditioning, fear extinctions e novel object recognition. L'arricchimento ambientale,

mentre determina un miglioramento delle performances in questi compiti nei topi wild- type, non provoca un ulteriore aumento delle prestazioni dei topi transgenici (Tang et al., 2001). Questa saturazione suggerisce l'esistenza di meccanismi molecolari comuni all'arricchimento ambientale ed all'incremento genetico delle funzioni dei recettori NMDA.

Arricchimento ambientale e sviluppo del sistema nervoso

A dispetto dell'ampia gamma di dati disponibili sugli effetti dell'arricchimento ambientale sull'organismo adulto, è stata scarsamente investigata la possibilità che un'ottimizzazione della stimolazione sensori- motoria, fornita dall'esposizione all'ambiente arricchito nelle fasi di vita precoci, induca modificazioni dello sviluppo del sistema nervoso.

Lo scarso interesse avuto per studi sull'arricchimento precoce può essere attribuito parzialmente al fatto che esso è caratterizzato da una minima interazione degli animali con l'ambiente nelle prime fasi di vita. Poiché elevati livelli di attività fisica e l'esplorazione dell'ambiente sono considerati una componente essenziale del protocollo di arricchimento (van Praag et al., 2000), ciò può spiegare come mai la possibilità di evocare modificazioni comportamentali e neurali con un protocollo di arricchimento precoce sia stata considerata piuttosto limitata. Per esempio, mentre è stato dimostrato che l'arricchimento ambientale in età adulta stimola la neurogenesi ipocampale (Kempermann et al., 1997; Nilsson et al., 1999), un effetto paragonabile non è stato riscontrato in protocolli di arricchimento precoce, consistenti in una complessa stimolazione tattile, olfattiva, visiva, acustica e vestibolare, alla quale i piccoli sono esposti da P7 a P21 (Kohl et al., 2002).

Tuttavia, poiché l'arricchimento ambientale precoce fornisce elevati livelli di stimolazione polisensoriale durante una fase di rimodellamenti anatomici e funzionali della corteccia cerebrale, è plausibile attendersi che agisca sullo sviluppo del sistema nervoso, tramite processi di plasticità dipendenti dall'esperienza.

Questo è confermato da sporadici lavori presenti in letteratura.

Infatti, una più complessa ramificazione dendritica è stata riscontrata nelle cellule piramidali corticali a seguito di un arricchimento ambientale da P10 a P24 (Venable et al., 1989). Questo effetto è particolarmente evidente nei neuroni piramidali della

corteccia parieto-occipitale (Venable et al., 1989; Fernandez et al., 2003).

Un significativo incremento del differenziamento neuronale è stato identificato anche nella corteccia motoria di ratti sottoposti ad arricchimento ambientale durante il periodo P5-P21; i soggetti arricchiti, inoltre, mostrano performances consistentemente migliori in molte risposte comportamentali adattative, misurate con diversi tests motori (Pascual e Figueroa, 1996).

Koo et al. (2003) hanno messo in luce, invece, che l'arricchimento dalla nascita può annullare tutti gli effetti deleteri dello stress prenatale sulle capacità cognitive, sulla proliferazione cellulare e sull'espressione delle proteine sinaptiche, ma anche che la neurogenesi dello strato granulare dell'ippocampo, i livelli di espressione di NCAM, sinaptofisina e BDNF nell'ippocampo ed in corteccia sono significativamente aumentati dall'allevamento in ambiente arricchito (Koo et al., 2003).

Abbiamo illustrato nel primo paragrafo che lo sviluppo dei sistemi sensoriali è fortemente influenzato dall'esperienza percettiva.

Quindi, è lecito attendersi che l'arricchimento ambientale precoce possa influenzare la maturazione dei sistemi sensoriali.

E' stata recentemente documentata un'influenza dell'arricchimento precoce sulle proprietà funzionali dei neuroni della corteccia uditiva, che mostrano un incremento dell'ampiezza delle risposte corticali a stimoli sonori (Engineer et al., 2004).

Inoltre, la capacità dell'allevamento in ambiente arricchito di trasformare le proprietà dei sistemi sensoriali è stata dimostrata anche per la corteccia somatosensoriale, anche se l'unico studio riguardante tale questione è stato condotto su animali adulti. In particolare, è stato osservato che il trasferimento di ratti ad un ambiente più simile a quello naturale, come quello arricchito, che promuove l'esecuzione del repertorio comportamentale completo di questa specie, induce un raffinamento funzionale su larga scala delle mappe corticali sensoriali, causando una contrazione della rappresentazione corticale delle vibrisse, associata ad una diminuzione delle dimensioni dei campi recettivi (Polley et al., 2004).

Queste scoperte sono supportate da studi comportamentali, che riportano un apprendimento più efficiente in compiti di discriminazione tattile in ratti adulti esposti ad arricchimento ambientale (Coq e Xerri, 1998; Bourgeon et al., 2004).

Forse l'analisi più completa e sistematica degli effetti dell'arricchimento ambientale precoce ci è pervenuta da due lavori di recente pubblicazione, che hanno dimostrato

che l'arricchimento ambientale influenza consistentemente lo sviluppo del sistema visivo (Bartoletti et al., 2004; Cancedda et al., 2004).

Nel prossimo paragrafo li descriveremo in dettaglio.

Arricchimento ambientale ed accelerazione dello sviluppo del sistema visivo

L'arricchimento ambientale previene gli effetti del dark-rearing sulla corteccia visiva

Bartoletti et al. (2004) hanno rilevato che l'arricchimento ambientale precoce previene gli effetti del dark-rearing sullo sviluppo della corteccia visiva: infatti, mentre una settimana di deprivazione monoculare è efficace in animali allevati al buio anche dopo la chiusura del periodo critico (Cynader e Mitchell, 1980; Mower, 1991; Fagiolini et al., 1994), lo stesso protocollo di alterazione sensoriale è improduttivo in animali arricchiti allevati al buio (Bartoletti et al., 2004), così come nei ratti adulti con una normale esperienza visiva.

L'arricchimento ambientale, dunque, promuove il consolidamento dello sviluppo delle connessioni visive, permettendo una normale chiusura del periodo critico anche in animali allevati al buio.

Il dark-rearing, inoltre, normalmente inibisce la maturazione del sistema inibitorio intracorticale e l'organizzazione in reti perineuronali (PNNs) dei condroitin-solfato proteoglicani (CSPGs), due fattori determinanti per la chiusura del periodo critico (Benevento et al., 1995; Pizzorusso et al., 2002).

E' stato riscontrato che l'arricchimento ambientale riduce significativamente gli effetti del dark-rearing sullo sviluppo delle PNNs e del sistema GABAergico (Bartoletti et al., 2004).

Infine, dal momento che il declino della plasticità corticale, che si osserva con lo sviluppo, è correlato con la maturazione dell'acuità visiva, sono stati analizzati gli effetti dell'arricchimento ambientale sulla maturazione dell'acuità visiva in ratti allevati al buio: l'acuità visiva di tali animali risulta normale (Bartoletti et al., 2004); l'arricchimento ambientale, dunque, promuove lo sviluppo dell'acuità visiva in animali allevati al buio (Figura 1.2).

Tuttavia, poiché i ratti, che vivono in un ambiente arricchito, ma al buio, non possono

fare affidamento su un aumentata stimolazione visiva, data la condizione di completa deprivazione visiva, questo studio indica la presenza di meccanismi di compensazione di meta-plasticità non sotto il diretto controllo dell'esperienza sensoriale.

Del resto l'arricchimento ambientale promuove l'espressione di molti fattori che possono controllare lo sviluppo e la plasticità della corteccia visiva (Pham et al., 2002).

L'arricchimento ambientale accelera lo sviluppo funzionale della corteccia visiva

Nello studio di Cancedda et al.(2004) è stato ulteriormente approfondito il contributo dell'arricchimento ambientale sullo sviluppo del sistema visivo ed è stata condotta un'analisi comparata dello sviluppo dell'acuità visiva negli animali arricchiti e negli animali non arricchiti, utilizzando il metodo comportamentale descritto da Prusky e colleghi (visual water box: Prusky et al., 2000a), che, essendo di natura non invasiva, permette misurazioni longitudinali dello sviluppo della funzionalità visiva.

In primo luogo, è stato osservato che gli animali arricchiti hanno prestazioni migliori degli animali standard nella fase di training: già questo primo dato è molto interessante, dal momento che indica che il protocollo di arricchimento ambientale dalla nascita è in grado di indurre un miglioramento delle prestazioni di apprendimento, una delle modificazioni che più spesso è stata riconosciuta tra gli effetti dell'arricchimento ambientale.

Il punto centrale, però, è che è stato scoperto che gli animali arricchiti mostrano un'accelerazione dello sviluppo dell'acuità visiva (Cancedda et al., 2004): essi, infatti, presentano un'acuità visiva pari a quella dell'adulto già a P25, mentre gli animali standard non raggiungono valori paragonabili fino a P40-P45. Inoltre, è stato osservato che gli animali arricchiti, anche a P43, presentano un'acuità visiva maggiore degli animali allevati in condizioni di laboratorio standard, a conferma dei risultati ottenuti da Prusky et al.(2000b).

Il precoce sviluppo dell'acuità visiva negli animali arricchiti è stato osservato anche tramite misurazioni elettrofisiologiche dei potenziali visivi evocati (VEPs)(Figura 1.3).

L'accelerazione dello sviluppo del sistema visivo, riscontrato in relazione al più precoce sviluppo dell'acuità visiva, è confermato anche da un'ulteriore osservazione: negli

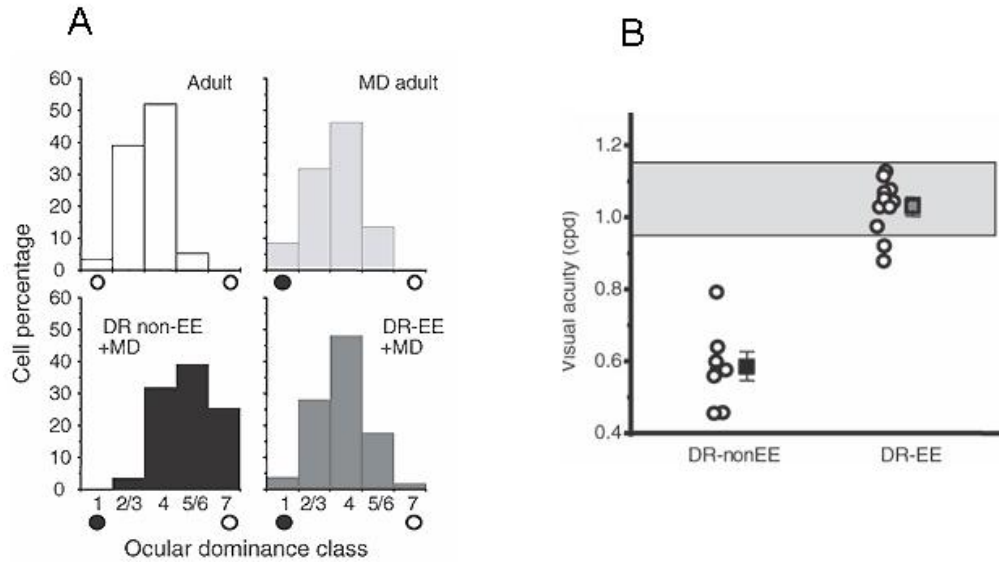


Figura 2: A. Distribuzioni di dominanza oculare in ratti adulti normali, in ratti adulti sottoposti ad 1 settimana di deprivazione monoculare (MD), in ratti deprivati allevati in dark-rearing (DR-SC + MD) ed in ratti deprivati allevati in dark-rearing ed in condizioni di arricchimento (DR-EE + MD). Solo nei ratti DR-SC + MD la deprivazione è efficace. B. L'arricchimento ambientale promuove lo sviluppo dell'acuità visiva in ratti allevati al buio. Riepilogo delle acuità visive degli animali dark-reared arricchiti e standard; il rettangolo ombreggiato è il range di acuità visiva normale dell'adulto. *Riadattato da Bartoletti et al. (2004)*

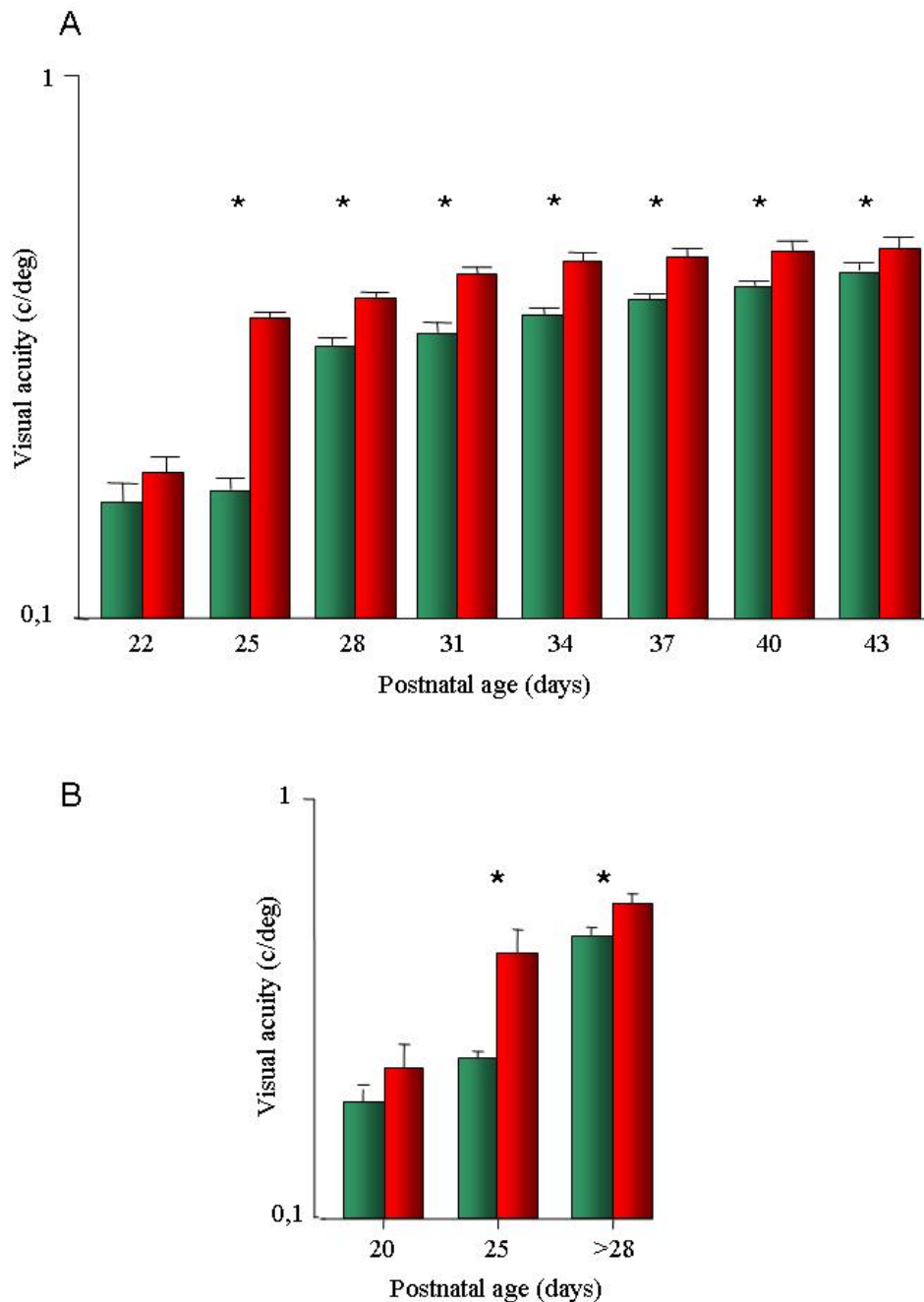


Figura 3: La maturazione dell'acuità visiva è accelerata in topi arricchiti dalla nascita. Analisi comportamentale (A) ed elettrofisiologica (B) dell'acuità visiva a differenti età in animali arricchiti (EE, rosso) e non arricchiti (SC, verde). Gli asterischi indicano le differenze statisticamente significative (ANOVA a due vie, $p < 0,001$; post-hoc Tukey test, $p < 0,05$). Le barre indicano il SEM. *Riadattato da Cancedda et al. (2004)*

animali arricchiti si ha un precoce declino del WM-LTP (Cancedda et al., 2004). WM-LTP è un modello in vitro dello sviluppo e della plasticità del sistema visivo, dal momento che la suscettibilità al potenziamento dei neuroni visivi corticali dello strato III è confinata ad un periodo critico precoce nella vita postnatale dei roditori (P18-P30 nel topo; Kirkwood et al., 1995; Huang et al., 1999).

Un possibile ruolo di BDNF e della circuiteria inibitoria?

Dal momento che topi che sovraesprimono BDNF esibiscono un'accelerazione dello sviluppo dell'acuità visiva, dovuta ad una precoce maturazione della circuiteria GABAergica (Huang et al., 1999), si è supposto che anche negli animali arricchiti si potesse osservare una maturazione precoce della circuiteria inibitoria.

Per analizzare lo sviluppo del sistema GABAergico nella corteccia visiva degli animali arricchiti, è stato usato, come marcatore, GAD65/67, due isoforme dell'acido glutammico decarbossilasi: analisi di Western blot per GAD65/67 su estratti proteici di cortecce visive di animali arricchiti e standard a diverse età hanno evidenziato un incremento dei livelli della proteina GAD65 negli animali arricchiti a P7 e P15 (Cancedda et al., 2004).

Inoltre, dal momento che lo sviluppo dell'acuità visiva può essere modulato dal BDNF (Huang et al., 1999), i cui livelli corticali sono noti essere influenzati dalle condizioni di arricchimento nell'adulto (Ickes et al., 2000; Pham et al., 2002), le cortecce occipitali di animali arricchiti e standard a differenti età postnatali sono state analizzate per i livelli di BDNF, usando un protocollo ELISA: sia negli animali arricchiti che in quelli standard i livelli proteici di BDNF mostrano un incremento in parallelo allo sviluppo e raggiungono un plateau a P20, ma gli animali arricchiti presentano livelli superiori di BDNF a P7 (Cancedda et al., 2004) (Figura 1.4).

Si è pensato, dunque, che i risultati sui livelli proteici di BDNF, sull'espressione di GAD65 e sullo sviluppo dell'acuità visiva, trovati negli animali arricchiti, possano essere correlati.

Infatti, negli ultimi anni è stato ipotizzato un ruolo del BDNF nella regolazione del sistema GABAergico (per una review, vedi Marty et al., 1997). In colture di cellule corticali, il BDNF promuove la crescita neuritica degli interneuroni, stimola la produzione di GABA (Collazo et al., 1992; Ip et al., 1993; Nawa et al., 1994; Widmer e Hefti, 1994; Marty et al., 1996) e regola l'efficacia dell'inibizione sinaptica (Rutheford

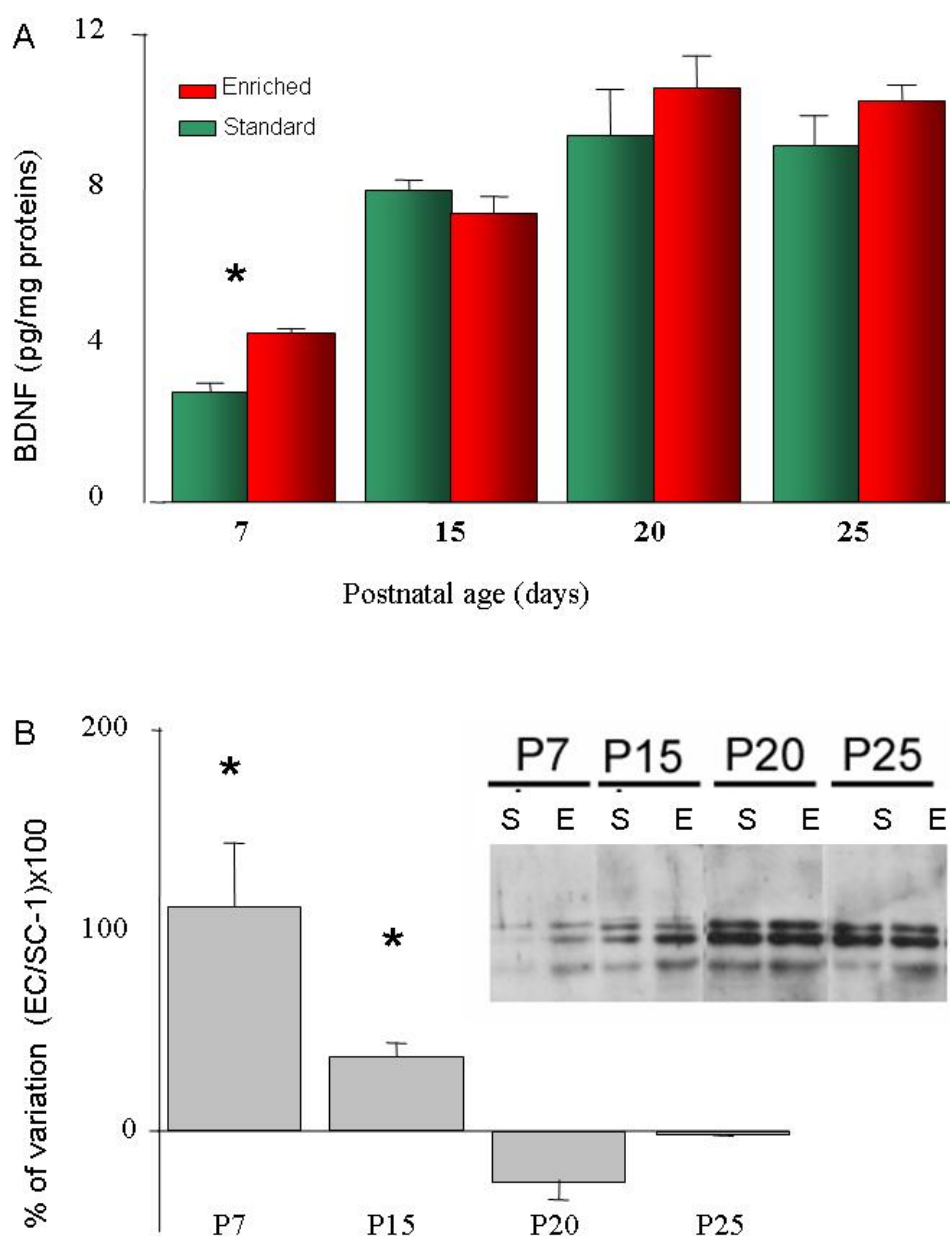


Figura 4: A. Livelli proteici totali di BDNF nelle cortecce occipitali di animali arricchiti (EE, rosso) e non arricchiti (SC, verde) a differenti età. L'asterisco indica la differenza statistica (t-test, $p < 0,001$). Le barre indicano il SEM. B. Percentuale di variazione dell'espressione di GAD65/67 nelle cortecce occipitali di animali EE e SC, calcolata come $[(EE/non-EE)-1] \times 100$, a differenti età. Gli asterischi indicano che l'espressione di GAD65/67 negli animali EE e SC è differente (t-test, $p < 0,001$). Le barre indicano il SEM. Nel riquadro, gel rappresentativo del Western blot. Riadattato da Cancedda et al. (2004)

et al., 1997, Rutheford et al., 1998; Sala et al., 1998). Inoltre, è stato dimostrato che la maturazione dell'inibizione corticale (Blue e Parnavelas, 1983 a, b; Benevento et al., 1992; Benevento et al., 1995), così come l'incremento dei livelli di mRNA di BDNF, che normalmente si verifica a seguito dell'apertura degli occhi (Castren et al., 1992), sono entrambi ritardati quando gli animali sono allevati al buio. Questi dati suggeriscono che l'espressione attività-dipendente di BDNF regola la maturazione degli interneuroni del sistema inibitorio.

In che modo le modificazioni dell'inibizione corticale possono a loro volta influenzare l'acuità visiva degli animali? Nei mammiferi si può osservare durante lo sviluppo postnatale un incremento dell'acuità visiva, dipendente dall'esperienza (Freeman e Marg, 1975; Boothe, 1985; Fagiolini et al., 1994), strettamente correlato con una diminuzione delle dimensioni dei campi recettivi dei neuroni della corteccia visiva primaria (Fagiolini et al., 1994). Il ruolo dell'inibizione corticale nella generazione delle proprietà dei campi recettivi neuronali è suggerito da esperimenti, i quali mostrano che l'applicazione extracellulare di antagonisti del GABA nella corteccia visiva o in quella somatosensoriale alterano profondamente queste proprietà (Sillito, 1979; Hicks e Dykes, 1983); inoltre, recentemente è stato dimostrato che l'infusione di antagonisti del GABA in corteccia visiva per mezzo di minipompe osmotiche determina un allargamento dei campi recettivi dei neuroni sia nel gatto che nel ratto (Ramoa et al., 1988; Harauzov et al., dati non pubblicati), suggerendo la possibilità che un incremento dell'inibizione in corteccia visiva possa risultare in dimensioni inferiori dei campi recettivi.

E' plausibile, quindi, che le modificazioni dell'acuità visiva, osservate negli animali arricchiti, possano essere, almeno in parte, causalmente correlate con le variazioni dell'espressione di BDNF e di GAD65: gli aumentati livelli di inibizione, stimolati dall'incremento di BDNF, possono causare un decremento delle dimensioni dei campi recettivi, che, a loro volta, potrebbero contribuire all'incremento dell'acuità visiva.

BDNF e rapporto madri-piccoli

E' interessante notare che la differenza nei livelli di BDNF evidenziata nelle cortecce visive di animali arricchiti e standard è molto precoce (P7), ad un'età in cui gli animali hanno ancora gli occhi chiusi e passano la maggior parte del loro tempo nel nido: questo suggerisce che è improbabile che i più elevati livelli di neurotrofine trovati nei

piccoli arricchiti siano determinati da un incremento dell'attività elettrica dovuta ad una maggior ricchezza visiva dell'ambiente o ad un maggior livello di movimento; è più probabile, invece, che i più alti livelli di BDNF siano dovuti ad un trasferimento di neurotrofine da madre ad embrione, attraverso la placenta, (le neurotrofine sono in grado di attraversare la barriera placentare; Goldstein et al., 1978; Heinrich e Meyer, 1988; Bigon et al., 1990; MacGrogan et al., 1992) o da madre a piccolo, attraverso il latte materno (la presenza di NGF è stata rilevata nel latte materno di topo e umano; inoltre è stato dimostrato l'uptake ed il trasporto transepiteliale di NGF nell'intestino del ratto lattante; Grueters et al., 1985; Gaull et al., 1985; Siminoski et al., 1986); un'altra possibilità è che l'effetto dell'arricchimento sui livelli di BDNF dei piccoli possa essere dovuto ad un differente comportamento materno delle madri arricchite rispetto a quelle standard (infatti, è stato dimostrato che un aumento delle cure materne incrementa l'espressione di BDNF nell'ippocampo dorsale; Liu et al., 2000).

I livelli di BDNF alla nascita sono uguali negli animali arricchiti ed in quelli standard (Sale et al., 2004): questo suggerisce un effetto postnatale piuttosto che prenatale dell'ambiente sul BDNF.

Una dettagliata analisi del comportamento di cure materne ha evidenziato che i piccoli cresciuti in condizioni di arricchimento esperiscono maggiori livelli di cure materne rispetto ai piccoli allevati in condizioni standard. Nei roditori le cure materne si verificano ad intervalli, alternate a periodi di assenza della madre, durante i quali i piccoli rimangono da soli nel nido: il tempo trascorso dai piccoli soli nel nido è molto più breve negli animali arricchiti che in quelli standard; i piccoli arricchiti non sono quasi mai soli nel nido. Uno dei più critici comportamenti materni per la normale crescita dei piccoli è la stimolazione orale e ano-genitale (licking), che è stata associata con la regolazione ormonale della crescita e con lo sviluppo delle risposte neuroendocrine e comportamentali allo stress (Liu et al., 1997). E' stato osservato che le madri arricchite leccano i loro piccoli più di quanto facciano le madri in altri contesti ambientali; inoltre, mentre i livelli di licking declinano progressivamente nelle condizioni standard, essi rimangono stabilmente alti, almeno nei primi 10 giorni dopo il parto negli animali arricchiti.

Quindi, livelli differenti di cure materne in differenti condizioni ambientali possono agire come mediatore indiretto per i più precoci effetti dell'arricchimento sullo svilup-

po del sistema visivo, determinando, per esempio, il picco di BDNF a P7 negli animali arricchiti (Sale et al., 2004).

Precoce espressione dei geni CRE negli animali arricchiti

E' stato osservato, grazie all'utilizzo di topi transgenici CRE-LacZ, che la finestra di espressione dei geni CRE negli animali arricchiti è accelerata rispetto agli animali standard di circa 5 giorni: nella corteccia visiva di animali standard a P10 c'è un basso numero di cellule, in cui si evidenzia espressione genica mediata da CRE; tale numero inizia ad aumentare a P20, ha un picco a P25 e rimane stabile in età adulta; negli animali allevati in arricchimento l'espressione dei geni CRE ha inizio più precocemente, ha un picco a P20 per poi diminuire e rimanere stabile già da P25 (Cancedda et al., 2004).

E' stato anche documentato che l'induzione farmacologica del pathway cAMP/CREB mima parzialmente gli effetti dell'arricchimento: infatti, il trattamento cronico in vivo da P7 a P28 di animali standard con rolipram (farmaco inibitore specifico della fosfodiesterasi di tipo IV ad alta affinità e, quindi, attivatore del sistema del cAMP; Tohda et al., 1996; Kato et al., 1998; Duman et al., 2001) determina un significativo aumento dell'acuità visiva degli animali a P25 (Cancedda et al., 2004) (Figura 1.5). Questi risultati suggeriscono che l'attivazione del sistema cAMP/CREB può modulare lo sviluppo dell'acuità visiva e che gli effetti dell'arricchimento ambientale sullo sviluppo dell'acuità visiva possono essere mediati almeno in parte da questo pathway molecolare.

Sviluppo dell'acuità visiva: ruolo di due differenti fasi temporali

Si può proporre un modello, secondo il quale due distinte fasi temporali, durante lo sviluppo dei piccoli, sono differenzialmente controllate dalla ricchezza dell'ambiente.

In una prima fase il maggiore apporto di fattori trofici, ricevuto dalla madre, e/o l'incremento dei livelli di cure materne possono determinare alcune modificazioni molecolari nel cervello dei piccoli arricchiti, che possono innescare il precoce sviluppo del loro sistema visivo.

Più tardi, dopo l'apertura degli occhi, quando i piccoli iniziano ad esplorare attivamente l'ambiente, la complessa stimolazione sensori-motoria fornita dall'ambiente

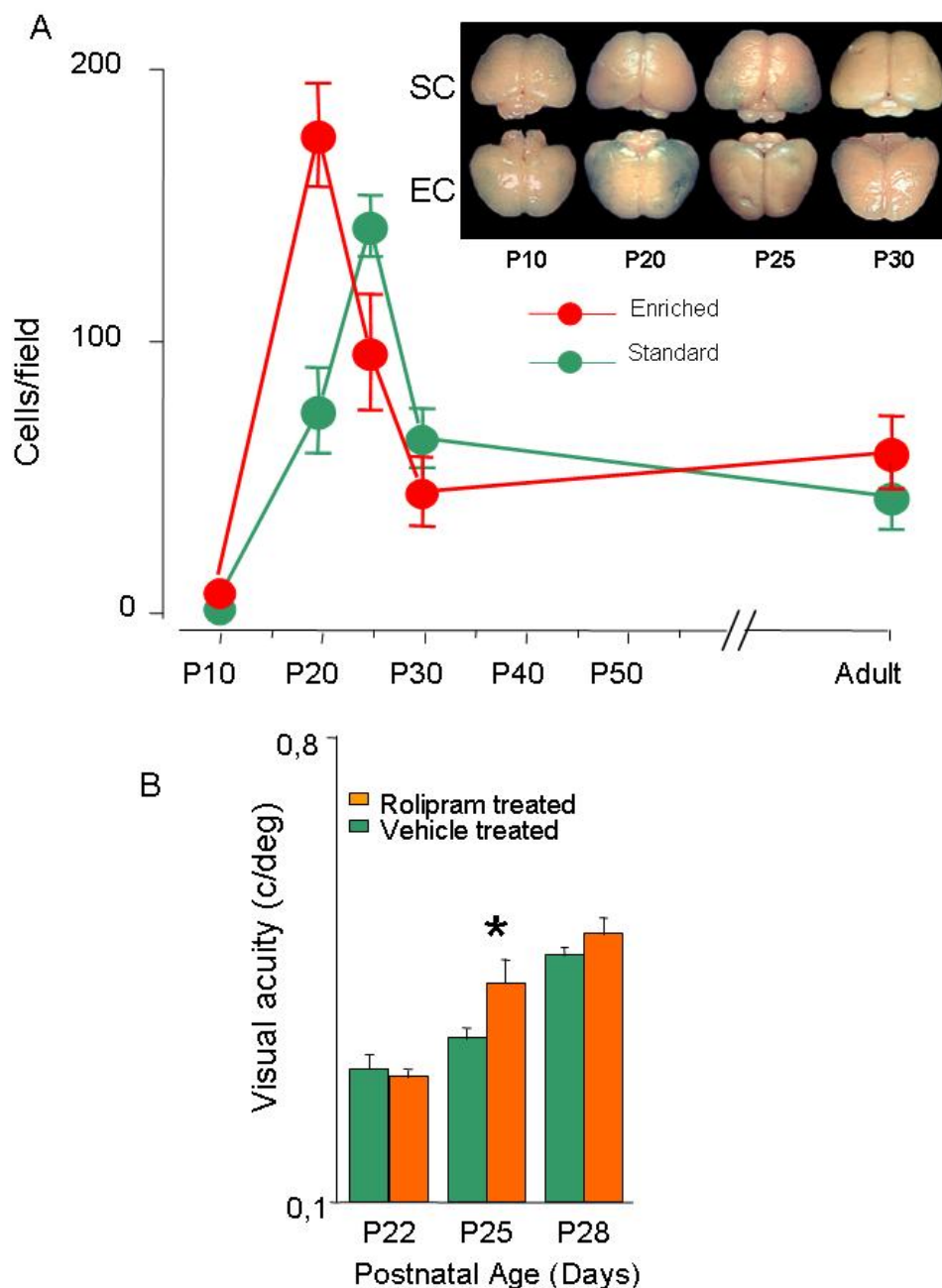


Figura 5: A. Quantificazione della densità di cellule positive a X-gal nella corteccia visiva degli animali arricchiti (EE, rosso) e degli animali non arricchiti (SC, verde) a differenti età. I cerchi rappresentano la densità media \pm SEM. L'espressione dei geni CRE è più precoce negli animali arricchiti (ANOVA a due vie, $p < 0,001$; post-hoc Tukey test, $p < 0,05$). Nel riquadro sono mostrati i cervelli di topi CRE-LacZ, trattati con X-gal. B. Analisi dell'acuità visiva di animali trattati con rolipram (arancio) e con il veicolo (verde) a differenti età. L'acuità visiva dei primi è significativamente differente (*) a P25 da quella dei secondi (Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks, $p < 0,001$, post hoc Student-Newman-Keuls test, $p < 0,05$). Le barre indicano il SEM. Riadattato da Cancedda et al. (2004)

arricchito può direttamente influenzare lo sviluppo del sistema visivo.

Anche questa seconda fase dell'arricchimento ambientale può controllare fattori importanti per lo sviluppo del sistema visivo.

Un candidato potrebbe essere IGF-I, che è un forte modulatore della crescita somatica fetale e neonatale (Olanrewaju et al., 1996). Poiché i recettori di IGF-I sono presenti nella corteccia occipitale (Frolich et al., 1998), IGF-I può influenzare l'espressione di molecole importanti per la plasticità corticale, come NGF e BDNF (Carro et al., 2000; Thoenen e Sendtner, 2002).

Insulin-like growth factor I

Froesch e collaboratori evidenziarono per la prima volta, ormai più di 40 anni fa che la maggior parte delle proteine del siero umano, responsabili delle attività di tipo insulinico, sono immunologicamente differenti dall'insulina (Froesch et al., 1963): solo il 5-10% di questa attività, infatti, può essere soppressa tramite anticorpi contro l'insulina.

Queste proteine con attività insulino-simile sono state isolate, effettuando una purificazione dalla frazione di Cohn del siero umano (Humbel et al., 1970).

In particolare, sono stati identificati due polipeptidi, che hanno effetti insulino-simili sia in vivo che in vitro (Froesch et al., 1975; Rinderknecht e Humbel, 1976). Inoltre, è stato mostrato che questi polipeptidi in vitro esercitano azioni simili ai fattori di crescita, dal momento che stimolano la sintesi di DNA, RNA, proteine e proteoglicani (Morell e Froesch, 1973; Zingg e Froesch, 1973; Froesch et al., 1975; Froesch et al., 1976; Rinderknecht e Humbel, 1976) e la proliferazione cellulare (Morell e Froesch, 1973; Haselbacher e Humbel, 1976).

Questi due polipeptidi sono stati chiamati fattori di crescita insulino-simili (insulin-like growth factor; IGF-I e IGF-II).

Struttura e sintesi di IGF-I

Più recentemente è stata determinata la completa sequenza amminoacidica di IGF-I, che mostra forti omologie con la struttura primaria della proinsulina (Rinderknecht e Humbel, 1978): in particolare, il segmento amminoacidico 1-29 è omologo alla catena

B dell'insulina, mentre il segmento 42-62 alla catena A dell'insulina; nessuna omologia è stata riscontrata, invece, tra il segmento 30-41 ed il peptide C della proinsulina e IGF-I, al terminale carbossilico, presenta una sequenza di 8 amminoacidi, che è assente nella proinsulina.

Un modello per la struttura terziaria di IGF è stato proposto in base alla stretta omologia di sequenza di IGF con quella dell'insulina: il ripiegamento tridimensionale di IGF sarebbe dunque simile a quello dell'insulina, anche se IGF-I è formato da una singola catena polipeptidica, che non va incontro a processamenti proteolitici prima di ripiegarsi nella sua struttura terziaria (Blundell et al., 1978)

IGF-I è sintetizzato principalmente nel fegato (Haselbacher et al., 1980) e la sua sintesi è regolata dall'ormone della crescita (GH) ipofisario (Daughaday e Rotwein, 1989; Clemmons e Underwood, 1991); IGF-I è, però, sintetizzato localmente anche in molti altri tessuti, tra cui il sistema nervoso: questo suggerisce che questo peptide possa avere ruoli autocrini o paracrini tessuto-specifici durante il corso del normale sviluppo e della vita dell'organismo (Behringer et al., 1990).

Poco è noto, tuttavia, sui fattori ed i meccanismi che regolano l'espressione di IGF-I nel sistema nervoso: ci sono evidenze, tuttavia, che l'ormone della crescita (Hynes et al., 1987; Lobie et al., 1993) e lo stato nutritivo (Lowe et al., 1989; Philipps et al., 1989) possano influenzare l'espressione cerebrale di IGF-I.

Studi su colture di cellule neuronali hanno, però, fornito evidenze, secondo le quali alcuni fattori di crescita sono in grado di regolare l'espressione di IGF-I. Per esempio, il fattore di crescita EGF stimola l'espressione di IGF-I in colture primarie di astroglia di ratto (Chernausk, 1993) ed il fattore di crescita bFGF promuove il rilascio di IGF-I in colture primarie di cellule epiteliali della cresta neurale (Drago et al., 1991) e di neuroni ipotalamici (Pons e Torres-Aleman, 1992). I glucocorticoidi sembrano, invece, deprimere l'espressione di IGF-I, sebbene pochi studi si siano indirizzati a dirimere tale questione (Adamo et al., 1988; Levinovitz e Norstedt, 1989). Infine, una varietà di lesioni possono indurre l'espressione di IGF-I in vivo negli astrociti: per esempio, gli astrociti esprimono IGF-I in risposta a lesioni ischemiche (Lee et al., 1992), meccaniche (Garcia-Estrada et al., 1992), elettrolitiche (Yamaguchi et al., 1991) e criogeniche (Yao et al., 1995).

IGF-I è legato a proteine specifiche ad alta affinità sia nel sangue che negli altri tessuti (IGFBPs; Baxter, 1991; Clemmons, 1991 a, b; Shimasaki e Ling, 1991; Duan, 2002):

si pensa che il legame con esse prolunghi l'emivita di IGF-I, impedendone la proteolisi, e moduli l'interazione del peptide con il relativo recettore, aumentando o diminuendo l'affinità di legame (per una review, vedi Clemmons, 1991 a, b; Clemmons, 1993).

Sono state identificate sei diverse IGFBPs, denominate IGFBP1-IGFBP6 (Shimasaki e Ling, 1991; Drop et al., 1992): queste proteine fanno parte di una famiglia proteica, che condivide un comune motivo cisteinico nei terminali amminico e carbossilico, che rende conto della loro capacità di legare IGF-I (Drop et al., 1992).

Recettori di IGF-I e cascate di trasduzione del segnale

L'azione di IGF-I è mediata dall'interazione con specifici recettori presenti sulla membrana cellulare (Rubin et al., 1983; Czech, 1989).

Il recettore specifico, a cui IGF-I si lega con elevata affinità, è il recettore per i fattori di crescita insulino-simili di tipo I (IGFR-I), ma l'ormone cross-reagisce, sebbene con livelli di affinità molto inferiori, con altri recettori (Massague e Czech, 1982): in particolare, IGF-I lega con moderata affinità il recettore per i fattori di crescita insulino-simili di tipo II (IGFR-II, che è il recettore specifico di IGF-II) ed ha scarsa affinità anche per il recettore dell'insulina (Massague e Czech, 1982).

Il recettore per IGF-I è un eterotetramero, composto da due subunità appaiate dalla presenza di legami disolfuro, ognuna delle quali, a sua volta, è costituita da una subunità α e da una subunità β : le subunità α sono extracellulari e sono responsabili del legame di IGF-I, mentre le subunità β sono unità transmembrana che, a livello citoplasmatico, possiedono un dominio tirosina chinasi. Si tratta, infatti, di recettori tirosina chinasi (Rubin et al., 1983; Morgan et al., 1986; Ullrich et al., 1986).

La maggior parte dei recettori dei fattori di crescita sono proteine chinasi transmembrana specifiche per la tirosina; la famiglia di recettori tirosina chinasi può essere divisa in alcune sottofamiglie strutturali, ma in tutti i casi i recettori si autofosforilano per iniziare la cascata di segnalazione intracellulare.

In che modo il legame di una proteina specifica alla porzione extracellulare di un recettore tirosina chinasi attiva il dominio catalitico sull'altro lato della membrana plasmatica? L'enigma è stato risolto quando è stato dimostrato che il legame della proteina ligando provoca l'assemblaggio del recettore dell'EGF in dimeri, permettendo ai due domini citoplasmatici di fosforilarsi a vicenda su residui multipli di

tirosina (autofosforilazione). Le tirosine autofosforilate servono da siti di legame ad alta affinità per diverse proteine di segnalazione intracellulari della cellula bersaglio. Si pensa che in questo modo l'autofosforilazione del recettore serva da interruttore per provocare l'assemblaggio temporaneo di un complesso di segnalazione intracellulare, che serve a ritrasmettere il segnale all'interno della cellula.

Recettori tirosina chinasi diversi legano combinazioni diverse di queste proteine segnale e attivano, perciò, risposte diverse (vedi Alberts et al., 1995).

I recettori di IGF-I agiscono in maniera leggermente differente.

In prima istanza, dal momento che i recettori sono già tetramerici, si pensa che il legame di IGF-I induca un'interazione allosterica delle due metà del recettore, invece che una dimerizzazione. In secondo luogo, il legame di IGF-I determina la fosforilazione del recettore a livello dei domini catalitici, che si attivano a fosforilare una proteina, chiamata substrato-1 del recettore dell'insulina (o IRS-1), su tirosine multiple. Le fosfotirosine su IRS-1 servono poi da siti di legame ad alta affinità per l'attracco e l'attivazione di proteine segnale intracellulari, molte delle quali si legano direttamente anche ad altri recettori tirosina chinasi attivati. (vedi Alberts et al., 1995) Diversi segnali extra- ed intracellulari modulano l'interazione di IRS con il recettore per IGF-I. Nella maggior parte dei casi la fosforilazione di IRS su residui di serina determina il suo disaccoppiamento dal recettore di IGF-I (Greene e Garofalo, 2002). Poiché IRS contiene numerosi potenziali siti di fosforilazione (Aguirre et al., 2002), è probabile che la regolazione tramite chinasi di questa proteina di ancoraggio sia molto complessa. Ad ogni buon conto, l'esistenza di questi meccanismi regolatori indica che il signaling di IGF-I può essere potenziato, diminuito o persino annullato da processi indipendenti dal ligando. Quindi variazioni del signaling di IGF-I dipendono non solo da modificazioni dei livelli di IGF-I, ma anche dalla biodisponibilità del peptide e dalla sensibilità cellulare all'attivazione del recettore. Per quanto riguarda il secondo caso i processi regolatori meglio documentati usualmente inducono una perdita di sensibilità a IGF-I, benché siano noti anche casi di potenziamento della risposta (Burgaud e Baserga, 1996).

Sebbene le proteine di segnalazione intracellulari, che si legano ai residui di fosfotirosina dei recettori tirosina chinasi attivati (e a IRS-1), abbiano strutture e funzioni varie, in genere hanno in comune due domini non catalitici altamente conservati, chiamati SH2 e SH3 per ragioni di omologia con Src 2 e 3.

I domini SH2 riconoscono tirosine fosforilate e permettono a proteine che li contengono di legarsi ai recettori tirosina chinasi attivati o alle IRS fosforilate.

La funzione del dominio SH3 è meno chiara, ma si pensa che si leghi ad altre proteine della cellula, probabilmente componenti della cascata di trasduzione del segnale più a valle.

Per quanto riguarda la cascata di trasduzione del segnale di IGF-I (LeRoith et al., 1995), una volta fosforilata, la proteina IRS lega un complesso proteico formato da Grb2, una proteina SH, e Sos. Questo complesso di tre proteine trasloca sul lato citoplasmatico della membrana ed attiva Ras.

Le proteine Ras appartengono alla superfamiglia Ras di GTPasi monomeriche. Come le altre proteine GTPasi monomeriche, le proteine Ras funzionano da interruttori che ciclano tra due stati conformazionali distinti: attivo, quando è legato GTP, e inattivo, quando è legato GDP.

I sistemi di trasmissione coinvolgono poi cascate interagenti multiple di fosforilazioni in serina/treonina: infatti, l'attivazione di Ras conduce, a sua volta, alla fosforilazione di Raf ed all'attivazione della cascata delle MAP chinasi (proteine chinasi attivate da mitogeno, chiamate anche chinasi regolate da segnali extracellulari, o ERK). Una volta che una MAP chinasi è attivata, trasmette il segnale a valle, fosforilando varie proteine della cellula, comprese altre proteine chinasi e proteine che regolano l'espressione genica.

Nella maggior parte dei casi, la trascrizione di una serie di geni precoci è attivata nel giro di pochi minuti dalla stimolazione di una cellula da parte di un fattore di crescita. Questi geni in genere codificano per fattori di trascrizione, che agiscono stimolando la trascrizione di geni di risposta più tardiva: i prodotti di questi geni sono gli effettori finali della stimolazione da parte di fattori di crescita.

La proteina IRS, tuttavia, lega anche la fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3K): l'azione immediata di questo enzima è quella di fosforilare l'anello di inositolo del fosfatidilinositolo in posizione 3 ed i fosfoinositidi prodotti in questo modo danno l'avvio ad una diversa cascata di trasduzione del segnale, che innesca la fosforilazione della proteina chinasi B/Akt (Summers e Birnbaum, 1997).

Nei tessuti periferici, così come nel sistema nervoso, l'attivazione di questa chinasi conduce alla traslocazione di trasportatori del glucosio (GLUTs), in particolare GLUT4 (Cheng et al., 2000), dai pools intracellulari alla membrana plasmatica, promuoven-

do così l'ingresso di glucosio nelle cellule (Kohn et al., 1996; Summers e Birnbaum, 1997). Anche l'attività esochinasica è significativamente ridotta nei neuroni di animali knock-out per IGF-I: questo suggerisce un ruolo di IGF-I anche nella regolazione dell'attività dell'esochinasi cerebrale, che influenza l'utilizzo di glucosio nelle cellule (Cheng et al., 2000).

Un altro bersaglio della proteina Akt nel signaling di IGF-I è la glicogeno sintasi chinasi 3β (GSK3 β): IGF-I stimola la fosforilazione inibitoria su una serina di questo enzima in neuroni in coltura (Hong e Lee, 1997a). Questa fosforilazione di GSK3 β (Summers et al., 1999) rileva l'inibizione di GSK3 β sulla glicogeno sintasi e sul fattore di trascrizione eIF2B, promuovendo così la sintesi di glicogeno e di proteine. Mentre l'accumulo di glicogeno è associato con gli astrociti nel cervello maturo, la sintesi di glicogeno neuronale è abbondante nello sviluppo postnatale durante la fase in cui si ha un picco dell'espressione di IGF-I (Borke e Nau, 1984; Bondy, 1991). Osservazioni su topi knock-out per IGF-I hanno fornito convincenti evidenze che GSK3 β sia coinvolta in pathways anabolici durante lo sviluppo cerebrale (Cheng et al., 2000).

Un altro substrato di GSK3 β è tau, una proteina associata ai microtubuli, coinvolta nella stabilizzazione di questi filamenti citoscheletrici. Studi in vitro hanno mostrato che IGF-I può modulare la fosforilazione di tau, tramite la mediazione di GSK3 β , determinando così un transiente incremento della fosforilazione di tau (Hong e Lee, 1997; Lesort e Johnson, 2000), funzionale alla riorganizzazione del citoscheletro necessaria per lo sviluppo e la crescita dei neuriti. Una volta iperfosforilata, tau tende a formare ammassi neurofibrillari intracellulari, che causano degenerazione neuronale. E' stato osservato che la fosforilazione di tau è incrementata nei neuroni di topi knock-out per IGF-I rispetto ai topi wild-type (Bondy e Cheng, 2004). La scoperta della modulazione della fosforilazione di tau è un'altra pedina che suggerisce che l'inibizione di GSK3 β indotta da IGF-I è un meccanismo centrale dell'azione di IGF-I, in particolare sul sistema nervoso centrale.

Infine, la proteina chinasi Akt determina la fosforilazione di proteine della famiglia Bcl-2, coinvolte nella regolazione della morte cellulare programmata: in particolare, stimola le proteine anti-apoptotiche ed inibisce quelle pro-apoptotiche.

Effetti sistemici di IGF-I

IGF-I media la maggior parte degli effetti dell'ormone della crescita (GH) sulla crescita somatica (Baxter, 1986; Daughaday e Rotwein, 1989; Behringer et al., 1990; Jones e Clemmons, 1995).

Numerose osservazioni, infatti, hanno indicato che le azioni dell'ormone somatotropo, sia sull'accrescimento corporeo che sul metabolismo, sono evocate nelle cellule bersaglio in modo più complesso di quanto avvenga per altri ormoni. La molecola ormonale, pur legandosi con una proteina recettrice membranale, può esplicare le sue azioni solo in presenza di altri fattori, che ne esaltano e completano gli effetti. Il primo di questi fattori ad essere identificato è stato denominato somatomedina. Sono stati poi riconosciuti altri fattori dello stesso tipo, facilitanti o medianti l'azione del GH, tanti da creare un gruppo, detto delle somatomedine: si tratta di peptidi che, per la loro somiglianza strutturale con il pro-ormone insulinico, sono anche noti come fattori di crescita insulino-simili (IGF); di questa famiglia fa parte IGF-I.

Il GH ha due principali azioni strettamente correlate: stimola l'accrescimento corporeo e regola il metabolismo cellulare. L'ormone somatotropo esplica un'intensa azione stimolante sull'accrescimento corporeo, soprattutto nel periodo giovanile; essa si esprime in vario modo sui diversi apparati, ma influenza principalmente lo sviluppo scheletrico. Nelle ossa lunghe il GH stimola, nelle cartilagini in accrescimento, la condrogenesi dal lato epifisario e l'ossificazione da quello diafisario, determinando così il loro allungamento e l'accrescimento della statura. Il GH stimola l'accrescimento anche di altri tessuti, provocando un aumento dimensionale dei visceri e della muscolatura scheletrica, un'azione che concorre ad aumentare il peso corporeo e che si interrompe normalmente dopo la pubertà. Il GH esplica la sua azione sullo sviluppo somatico stimolando la moltiplicazione e l'accrescimento delle cellule.

A livello metabolico, il GH ha azione anabolica. La più intensa azione metabolica del GH sulle cellule di tutti i tessuti, ma particolarmente evidente su quelle del fegato e del muscolo, consiste nell'aumento della produzione e dell'accumulo di proteine. Per quanto riguarda il metabolismo glucidico e lipidico, il GH esercita un'azione lipocinetica e lipolitica: favorisce, cioè, sia la mobilizzazione dei lipidi dal tessuto adiposo che il loro ingresso e la demolizione ossidativa delle loro molecole nelle cellule degli altri tessuti. Il GH, inoltre, determina una diminuzione del catabolismo dei glucidi,

quindi tende decisamente ad orientare il metabolismo cellulare verso l'utilizzazione dei lipidi, quali fonti energetiche preferenziali: l'ormone, infatti, facilita la trasformazione in glicogeno del glucosio, che entra nelle cellule, e deprime la glicolisi (vedi Casella-Taglietti, 1996).

Espressione di IGF1 nel sistema nervoso centrale

Molti lavori suggeriscono che IGF-I sia una proteina importante anche per il sistema nervoso centrale, in particolar modo perché svolge un ruolo essenziale durante lo sviluppo (per una review, vedi D'Ercole et al., 1996; Anlar et al., 1999; D'Ercole et al., 2002).

Infatti, benché IGF-I sia sintetizzato principalmente nel fegato, è prodotto anche in molti altri tessuti del corpo, tra cui il sistema nervoso.

I primi studi sul pattern di espressione di IGF-I nel sistema nervoso centrale hanno analizzato il contenuto di mRNA di questo fattore di crescita in varie fasi dello sviluppo embrionale e postnatale: è stato dimostrato che IGF-I è abbondantemente espresso nel cervello di ratto a partire da E14, ma declina rapidamente, raggiungendo un plateau già a P1 (Rotwein et al., 1988; Werther et al., 1990; Bondy et al., 1993). Responsabili della sintesi cerebrale di IGF-I sono sia le cellule gliali che i neuroni (Rotwein et al., 1988).

IGF-I, dunque, ha un pattern di espressione, regolato durante lo sviluppo, che presenta un picco in coincidenza con le fasi precoci della crescita neuronale.

Tuttavia, studi successivi, tramite ibridazione in situ, hanno analizzato l'espressione di IGF-I durante la maturazione di differenti gruppi di neuroni funzionalmente correlati (Bartlett et al., 1991; Bondy, 1991; Bondy e Lee, 1993) ed hanno rilevato che, nei diversi sistemi di neuroni presi in considerazione, il picco di espressione di IGF-I è confinato ad una diversa e specifica finestra temporale, correlata alle variazioni regionali dei tempi di sviluppo.

Per esempio, lo sviluppo della corteccia cerebellare di ratto ha luogo nelle prime settimane postnatali e, durante questo periodo, si osserva un'intensa espressione di IGF-I nei principali neuroni del cervelletto, le cellule del Purkinje. L'espressione di IGF-I è marcata anche durante la maturazione dei nuclei di ritrasmissione del cervelletto (Bondy, 1991; Aguado et al., 1992; Torres-Aleman et al., 1994).

Nell'ippocampo l'espressione di IGF-I è elevata durante le prime due settimane di vita postnatale, ma permane più a lungo ad alti livelli nel giro dentato, nel quale la proliferazione cellulare non è confinata alle fasi di sviluppo.

IGF-I è abbondantemente espresso nel sistema somatosensoriale in maturazione: i più alti livelli di mRNA di IGF-I sono stati trovati nei nuclei talamici nelle prime tre settimane postnatali, ma esso è anche transientemente localizzato nei neuroni di proiezione del nucleo sensoriale del trigemino; cellule contenenti mRNA di IGF-I sono presenti anche nei nuclei della colonna dorsale del midollo spinale (Bondy, 1991).

L'espressione di IGF-I è marcata durante le ultime fasi di vita embrionale nel bulbo olfattivo, mentre inizia solo nei primi giorni di vita postnatale nella corteccia piri-forme (Bondy, 1991).

Questa osservazione suggerisce che IGF-I venga espresso più precocemente nelle strutture periferiche e solo successivamente nelle strutture più centrali. Tale ipotesi è stata confermata dall'analisi del pattern di espressione di IGF-I nelle diverse stazioni di trasmissione del sistema visivo: infatti, nelle cellule gangliari retiniche è più precoce (a cavallo tra vita embrionale e prima vita postnatale) di quanto non sia nel collicolo superiore, nel tetto ottico e nel talamo (Bondy, 1991). In corteccia visiva, tuttavia, non è mai stata studiata la presenza di IGF-I.

Altre strutture del sistema nervoso centrale, che esprimono IGF-I durante lo sviluppo, sono elencate nella tabella (Figura 1.6) della pagina seguente (Bondy, 1991). Gli studi di ibridazione in situ hanno dimostrato, quindi, che l'espressione del gene di IGF-I presenta un picco solo per un breve periodo di tempo, che differisce nelle varie regioni, durante la maturazione del sistema nervoso.

IGF-I è espresso anche in molte regioni del sistema nervoso del ratto adulto: nel cervello maturo è particolarmente elevato il contenuto di IGF-I nell'ippocampo, nel bulbo olfattivo e nel cervelletto (Rotwein et al., 1988; Werther et al., 1990; Bondy et al., 1993).

Analisi quantitative del contenuto proteico di IGF-I nel sistema nervoso hanno dimostrato che la presenza di questo ormone è più diffusa e consistente di quanto ci si sarebbe potuti aspettare dagli studi di localizzazione dell'mRNA, sia durante lo sviluppo che nella vita adulta (Yamaguchi et al., 1990; Garcia-Segura et al., 1991).

Diversi studi hanno dimostrato che IGF-I attraversa la barriera ematoencefalica (Duffy et al., 1988; Reinhardt e Bondy, 1994; Armstrong et al., 2000; Carro et al., 2000; Pul-

System	Component	Period ^a
Cerebellar	Purkinje cell	D4-D28
	Inferior olive	E20-D21
	Deep cerebellar nuclei	E20-D21
	Red nucleus	D4-D28
	Ventrolateral nucleus	D4-D21
Somatosensory	Spinal trigeminal nucleus	E20-D21
	Ventrobasilar nucleus	D4-D21
	Gelatinosa nucleus	E20-D14
	Intralaminar nucleus	E18-
	Anterior pretectal nucleus	E16-D28
Olfactory	Dorsal column nucleus ^b	D0-
	Mitral cell	E16-
	Tufted cell	E18-
Visual	Piriform cortex ^c	D7-
	Retinal ganglion cells	E20-D10
	Superior colliculus	D0-
	Lateral geniculate nucleus	D7-D28
Auditory-vestibular	Lateral posterior nucleus	D7-D28
	Anterior pretectal nucleus	E16-D28
	Medial vestibular nucleus	E20-D21
	Superior vestibular nucleus	E20-D21
	Dorsal cochlear nucleus	E20-D14
	Ventral cochlear nucleus	D0-D14
	Superior olive	E20-
	Lateral lemniscal nucleus	E20-D28
	Medial geniculate nucleus	D4-D21
	Inferior colliculus	D0-D28
Other	Interstitial nucleus	E20-D14
	Nucleus basalis	E20-D14
	Diagonal band nucleus	E20-D21
	Lateral septal nucleus	E20-D21
	Medial habenula	E20-D14
	Ventral tegmental nucleus	E20-D14
	Dorsal tegmental nucleus	E20-D14
	Entopeduncular nucleus	D0-D21
	Parafascicular nucleus	E16-D7
	Retroflexus nucleus	E16-D7
	Parabrachial nucleus	E20-D7
	Substantia nigra, pars lateralis	D0-D21
	Hippocampus ^d	E20-D28
	Neocortex ^e	D0-D28

Figura 6: *Tratta da Bondy, 1991*

ford e Ishii, 2001) e, quindi, il cervello è influenzato anche dalla componente ematica di IGF-I.

E' stato suggerito che i recettori di IGF-I e le IGFBPs, che sono abbondantemente espressi sui capillari cerebrali (Frank et al., 1986; Rosenfeld et al., 1987; Duffy et al., 1988; Lee et al., 1993), possano facilitare il transito di IGF-I al cervello (Reinhardt e Bondy, 1994), benché un recente lavoro escluda il coinvolgimento dei recettori IGF-I e delle IGFBPs e suggerisca un trasporto mediato da un carrier specifico (Pulford e Ishii, 2001).

Espressione del recettore di IGF-I e delle IGFBPs nel sistema nervoso

Il recettore di IGF-I è stato biochimicamente identificato e caratterizzato nel cervello adulto di topo, ratto e uomo (Gammeltoft et al., 1988; Ocrant et al., 1988; Santos et al., 1994). La sua espressione è ampiamente distribuita nel cervello di ratto adulto (Bohannon et al., 1988; Frolich et al., 1998): virtualmente tutte le regioni cerebrali posseggono siti di legame.

Tramite ibridazione in situ, è stato dimostrato che l'mRNA del recettore è ampiamente espresso nel sistema nervoso centrale del ratto, già a partire da E14 (Bondy et al., 1990). Studi quantitativi indicano che il picco di espressione del recettore si verifica tra E15 e E20 (Baron-Van Evercooren et al., 1991). Assunti contestualmente, questi dati suggeriscono che il recettore per IGF-I è ubiquitario nel cervello e che la sua espressione prende avvio precocemente durante lo sviluppo.

IGFBP-2, 4 e 5 sono le proteine IGFBPs espresse in maggior quantità nel cervello. L'espressione di IGFBP-2 inizia precocemente durante l'embriogenesi del ratto, almeno a E7 (Wood et al., 1992); nella vita postnatale, tale espressione è confinata all'astroglia (Lee et al., 1993). Durante lo sviluppo i siti di espressione di questa proteina e di IGF-I sono spesso temporalmente e spazialmente correlati, in particolare a livello di cervelletto, retina, sistemi sensoriali (Wood et al., 1990; Wood et al., 1992; Lee et al., 1992; Lee et al., 1993), suggerendo che l'interazione di IGFBP-2 con IGF-I possa influenzare la fisiologia di IGF-I, incrementando la sua concentrazione vicino alle cellule in cui agisce o modulandone gli effetti.

L'espressione di IGFBP-4 è più diffusa in fasi avanzate dello sviluppo (Brar e Chernausk, 1993; Stenvers et al., 1994): a E20 si ha espressione nei neuroni dei gangli basali, nel periodo postnatale precoce l'ippocampo inizia ad esprimere IGFBP-4 e nel

ratto adulto IGFBP-4 è anche espresso nei neuroni degli strati II e IV della corteccia cerebrale, nel bulbo olfattivo e nell'amigdala.

L'mRNA di IGFBP-5, come IGFBP-2, esibisce un pattern di espressione temporale, che sembra essere coordinato con l'espressione di IGF-I (Bondy e Lee, 1993; Brar e Chernauek, 1993). Per esempio, IGFBP-5 e IGF-I sono coespressi nei neuroni dei sistemi sensoriali, come quelli del bulbo olfattivo, dei corpi del genicolato e nei nuclei vestibolari (Bondy e Lee, 1993).

Per quanto riguarda IGFBP-3, invece, non sono riportati in letteratura studi della sua espressione nel cervello in condizioni fisiologiche, ma è stato osservato che la trascrizione del suo mRNA è indotta a seguito di danno ischemico (Gluckman et al., 1992). IGFBP-1 non sembra essere espresso nel cervello; tuttavia, questa proteina potrebbe essere importante per la funzione del sistema nervoso periferico, dal momento che è stata localizzata tramite analisi immunoistochimica a livello delle sinapsi delle giunzioni muscolari (Ma et al., 1994 a, b)

Effetti di IGF-I sul sistema nervoso centrale

In questo paragrafo passeremo in rassegna i lavori, che hanno dato concretezza all'ipotesi, secondo la quale IGF-I svolge un ruolo importante sui neuroni e sulle cellule gliali durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale.

Studi in vitro sulle azioni di IGF-I

I primi studi riguardanti il ruolo di IGF-I sul sistema nervoso sono stati condotti in vitro su specifici tipi cellulari neurali.

Påhlman et al. (1991) hanno mostrato che IGF-I stimola la proliferazione cellulare di cellule della linea del neuroblastoma SH-SY5Y indifferenziate ed incrementa il loro differenziamento, quando indotto con esteri di forbolo.

Numerose sono state le osservazioni analoghe, effettuate su colture primarie di cellule neuronali. Cellule neuroepiteliali di embrione di topo in coltura sembrano essere dipendenti da IGF-I per la proliferazione e la sopravvivenza (Drago et al., 1991). Queste cellule sintetizzano IGF-I e, benché sia stato osservato che esse proliferano in risposta a bFGF, questa risposta è completamente inibita dall'incubazione con anticorpi contro IGF-I, indicando che IGF-I media, almeno in parte, l'azione di bFGF su

queste cellule progenitori del sistema nervoso centrale.

IGF-I stimola anche la proliferazione di colture di neuroni embrionali e di precursori gliali di topo (Lenoir e Honegger, 1983). Inoltre, è stato anche mostrato che IGF-I stimola la mitosi di neuroblasti simpatici cervicali (Di Cicco-Bloom e Black, 1989) e di neuroni del bulbo olfattivo di ratto (Werther et al., 1993).

Studi su neuroni corticali di ratto (Aizeman e DeVellis, 1987) e di embrioni di pollo (Neff et al., 1993) e su motoneuroni spinali di topo (Ang et al., 1992; Ang et al., 1993), infatti, indicano che IGF-I promuove la sopravvivenza, ma non stimola la proliferazione dei neuroni. Torres-Aleman et al. (1990) hanno evidenziato che IGF-I promuove la sopravvivenza di neuroni ipotalamici di ratto in coltura.

Torres-Aleman et al. (1992) hanno osservato anche che cellule del Purkinje di ratto sopravvivono in coltura in presenza di IGF-I nel mezzo; similmente si comportano le cellule granulari del cervelletto (D'Mello et al., 1993).

Altre evidenze suggeriscono che IGF-I stimola anche il differenziamento di alcune popolazioni neuronali.

Per esempio, è stato mostrato che IGF-I incrementa il numero di cellule catecolaminergiche nella cresta neurale di embrioni di quaglia in coltura (Nataf e Monier, 1992) e stimola l'allungamento dei neuriti e l'espressione della acido glutammico decarbossilasi in neuroni corticali in coltura (Aizeman e DeVellis, 1987). Inoltre, IGF-I promuove la crescita neuritica in colture di neuroni simpatici espuntati dai gangli lombosacrali dell'embrione di pollo (Zackenfels et al., 1995), ma anche il differenziamento postmitotico di colture di neuroni sensoriali, isolati dai gangli delle radici dorsali di ratti adulti (Fernyhough et al., 1993).

Recentemente è stato osservato che IGF-I stimola il differenziamento neuronale delle cellule staminali del cervello di ratti adulti (Brooker et al., 2000), mentre in colture di cellule staminali embrionali, incubate con IGF-I, si rileva un decremento del numero di neuroni differenziati (Schechter e Abboud, 2001).

Riepilogando, questi lavori suggeriscono che IGF-I ha ruoli diversi in fasi successive dello sviluppo del sistema nervoso; in particolare, in un primo tempo, è importante per la proliferazione dei progenitori delle cellule neurali, successivamente è coinvolto nel mantenimento della sopravvivenza dei neuroni ed infine nel differenziamento di specifiche popolazioni neuronali.

Modelli di topi transgenici per lo studio in vivo del ruolo di IGF-I

Gli studi in vivo sull'azione di IGF-I si sono focalizzati principalmente sui topi transgenici con alterazioni genetiche dell'espressione di IGF-I, del suo recettore e delle IGFBPs.

Sono state generate molte linee di topi con alterazioni genomiche del sistema proteico di IGF-I (per una review, vedi D'Ercole et al., 1996; D'Ercole et al., 2002). La tabella (Figura 1.7), riportata di seguito, elenca i topi transgenici, che presentano mutazioni a vari livelli nel sistema proteico di IGF-I e che manifestano modificazioni dello sviluppo e/o del fenotipo cerebrale.

Protein	Description of Mutant Line	Abbreviation in Text	Brain Phenotype
IGF-I	m Metallothionein-I (mMT-I) driven hIGF-IA cDNA	mMT-I/IGF-I	Increased postnatal brain growth
	m IGF-II 5' flanking region	mIGF-II/IGF-I	Increased postnatal brain growth, especially the cerebellum
	Gene ablation by homologous recombination:	IGF-I KO	
	Heterozygous ablation	IGF-I ^{+/-}	No abnormality
	Homozygous ablation	IGF-I ^{-/-}	Brain growth retardation
IGF1R	Partial gene ablation by homologous recombination	Midi-IGF-I	Brain growth retardation
	Gene ablation by homologous recombination:	IGF1R KO	
	Heterozygous ablation	IGF1R ^{+/-}	No abnormality
IGFBP-1	Homozygous ablation	IGF1R ^{-/-}	Brain growth retardation
	mMT-I promoter driven hIGFBP-1 cDNA	mMT-I/hIGFBP-1	Postnatal brain growth retardation
	m Phosphoglycerate Kinase-1 promoter driven rIGFBP-1 gene	mPGK/rIGFBP-1	Brain growth retardation from fetal life
	h α -1 antitrypsin promoter driven hIGFBP-1 cDNA	α -1AT/hIGFBP-1	Brain abnormalities
IGFBP-2	CMV promoter driven mIGFBP-2 cDNA	CMV/IGFBP-2	Brain growth retardation

Figura 7: *Tratta da D'Ercole et al. (2002)*

I primi topi transgenici studiati sono stati quelli che sovraesprimono IGF-I (Mathews et al., 1988a; Behringer et al., 1990). La linea iniziale di topi transgenici è stata creata, usando un transgene, guidato dal promotore murino della metallothioneina (mMT-1), e codificante cDNA di IGF-I umano.

I topi di tale linea e di quelle successive, generate con lo stesso gene di fusione, sovraesprimono IGF-I in molti tessuti a partire dalla nascita (Mathews et al., 1988b; Ye et al., 1995).

In relazione al grado di espressione del transgene nei tessuti nelle diverse linee di questi topi, una ragguardevole crescita somatica inizia a 3-4 settimane di età e conduce in età adulta ad un incremento di peso di circa il 30% rispetto ai topi standard.

Questi topi presentano una crescita particolarmente sproporzionata di alcuni organi, in particolare del cervello (Ye et al., 1995; Ye et al., 1996), in relazione al grado di espressione organo-specifica del transgene, diverso nelle varie linee di topi mutanti. Per esempio, l'incremento del peso della massa cerebrale varia da 25% a 85% nelle diverse linee di topi transgenici MT-I/IGF-I (Mathews et al., 1988b; Behringer et al., 1990; Ye et al., 1995; O'Kusky et al., 2000).

I topi con il maggior sviluppo della massa cerebrale spesso non sopravvivono dopo lo svezzamento e raramente si riproducono. Le ragioni di questo evento non sono, però, chiare, ma non sembra che ciò sia dovuto ad idrocefalia o allo sviluppo di tumori (D'Ercole et al., 2002).

Sono stati creati un gran numero di altri topi transgenici IGF-I, usando diversi tipi di promotori, in modo da ottenere una sovraespressione di IGF-I organo-specifica (per una review, vedi D'Ercole et al., 2002). Per esempio, usando un frammento della regione genomica regolatrice di IGF-II murino, è stata generata una linea di topi transgenici, che sovraesprime IGF-I solo nel sistema nervoso centrale (Ye et al., 1996): benché il transgene sia espresso diffusamente nel cervello, la sua espressione è marcatamente aumentata nel cervelletto e ciò determina un raddoppiamento del peso di questa struttura rispetto allo standard; altre aree cerebrali interessate sono corteccia cerebrale, ippocampo, diencefalo e tronco encefalico (O'Kusky et al., 2000). La sovraespressione di IGF-I a livello cerebrale incrementa il numero di neuroni, come evidenziato dall'aumento del contenuto di DNA (Behringer et al., 1990), le dimensioni dei corpi cellulari dei neuroni, l'estensione delle ramificazioni neuritiche (Gutierrez-Ospina et al., 1996), il contenuto di mielina (Ye et al., 1995).

La generazione e lo studio dei topi portatori di delezioni dei geni di IGF-I e del recettore di IGF-I hanno fornito evidenze dirette del ruolo importante di IGF-I nella crescita somatica e del recettore IGFR-I nel mediare le azioni di IGF-I (Efstratiadis, 1998).

I topi omozigoti per la delezione di IGF-I, cioè i topi knock-out, hanno un marcato ritardo della crescita embrionale e postnatale ed hanno scarse probabilità di sopravvivere dopo la nascita (Baker et al., 1993; Liu et al., 1993; Powell-Braxton et al., 1993). I topi knock-out per il recettore di IGF-I esibiscono un ritardo ancora più consistente della crescita embrionale ed invariabilmente non sopravvivono al parto.

La delezione eterozigote sia di IGF-I che del recettore ha, invece, un impatto meno

drammatico (Baker et al., 1993).

I cervelli dei topi knock-out sono molto più piccoli rispetto ai controlli, sebbene il ritardo nello sviluppo risulti meno marcato rispetto a quello somatico; non sono state riscontrate, però, anomalie morfologiche (Baker et al., 1993; Liu et al., 1993). Alla nascita la caratteristica istologica più sorprendente in questi topi è l'incremento della densità dei corpi cellulari dei neuroni (Liu et al., 1993). Deficits in specifiche popolazioni neuronali (cellule granulari del giro dentato dell'ippocampo e neuroni striatali parvalbuminergici) sono stati identificati in un'altra linea di topi knock-out per IGF-I (Beck et al., 1995); questi animali sono caratterizzati anche da scarsa mielinizzazione del sistema nervoso centrale e decremento del numero degli oligodendrociti.

Sono state generate anche alcune linee di topi transgenici con un'alterata espressione delle IGFBPs (per una review, vedi Schneider et al., 2000).

La prima è stata una linea di topi sovraesprimenti IGFBP-1 (D'Ercole et al., 1994). IGFBP-1 è un inibitore dell'azione di IGF-I, quando presente in concentrazioni elevate. Usando differenti promotori, molti gruppi hanno creato topi transgenici per IGFBP-1: ogni linea esibisce un marcato ritardo dello sviluppo somatico e cerebrale (Murphy et al., 1993; D'Ercole et al., 1994; Ye et al., 1995; Gay et al., 1997).

Sono state create anche linee di topi transgenici sovraesprimenti IGFBP-2, -3, -4 e -5.

I topi transgenici per IGFBP-2 sono caratterizzati da una modesta riduzione del peso della massa cerebrale (Hoefflich et al., 2001). Nessuna modificazione dello sviluppo o della morfologia cerebrale è stata osservata nei topi transgenici per IGFBP-3 (Murphy et al., 1995). I topi transgenici per IGFBP-4 sono stati generati, usando un promotore che non promuove l'espressione della proteina nel sistema nervoso centrale, per cui questi animali non presentano alterazioni delle dimensioni cerebrali (Wang et al., 1998). La sovraespressione di IGFBP-5, invece, inibisce lo sviluppo somatico e cerebrale (Salih et al., 2004), quando l'espressione della proteina è indotta già durante la gestazione; nei topi, in cui il gene di IGFBP-5 è fuso con il promotore MT-1, l'espressione della proteina ha inizio nel periodo postnatale e si può notare un piccolo incremento del peso cerebrale (D'Ercole et al., 2002).

I topi portatori di delezioni dei geni delle IGFBPs non hanno nessun tratto fenotipico anomalo (Pintar et al., 1995; Pintar et al., 1996): presumibilmente, l'assenza di una singola proteina IGFBP è compensata dalle altre.

IGF-I: neurogenesi, apoptosi e sinaptogenesi

Quanto abbiamo riportato sull'espressione di IGF-I e delle proteine ad esso correlate, sugli studi in vitro e sulle linee di topi transgenici indica che IGF-I promuove lo sviluppo del sistema nervoso centrale, incrementando il numero dei neuroni e delle connessioni sinaptiche, in parallelo all'estensione delle arborizzazioni neuritiche dei singoli neuroni.

Inoltre, l'incremento del numero di neuroni sembra derivare sia da un incremento della proliferazione neuronale che da un'inibizione dell'apoptosi durante la fase dello sviluppo caratterizzata da una massiva ondata di morte neuronale.

Analisi morfometriche e stereologiche del cervello di topi transgenici sovraespressanti IGF-I hanno riportato un sostanziale incremento del numero totale di neuroni nella corteccia cerebrale (Gutierrez-Ospina et al., 1996), nella corteccia cerebellare (Ye et al., 1996), nel giro dentato dell'ippocampo (O'Kusky et al., 2000) ed in alcuni nuclei del tronco dell'encefalo (Dentremont et al., 1999). Al contrario, in animali con delezione del gene IGF-I (Beck et al., 1995; Camarero et al., 2001) e topi transgenici IGFBP-1 (Gutierrez-Ospina et al., 1996; Ni et al., 1997) è stata osservata una diminuzione del numero di neuroni nella corteccia cerebrale, nel giro dentato dell'ippocampo, nello striato e nel nucleo cocleare.

Mentre gli studi in vitro hanno evidenziato che IGF-I è essenziale per la proliferazione ed il differenziamento neuronale (per una review, vedi D'Ercole et al., 1996), la maggior parte delle evidenze in vivo documentano un'azione antiapoptotica di IGF-I. Studi morfometrici dettagliati sono stati effettuati solo in topi transgenici, in cui l'espressione di IGF-I inizia nel periodo postnatale, quando la fase di proliferazione si è conclusa nella maggior parte delle regioni del sistema nervoso centrale (Hicks e D'Amato, 1968; Spreafico et al., 1995; Verney et al., 2000).

Iniezioni intraperitoneali di BrdU (5-bromo-2'-deossiuridina) non hanno evidenziato una differenza nella proporzione delle cellule marcate tra i topi transgenici e quelli normali (Ye et al., 1996; Dentremont et al., 1999; Camarero et al., 2001).

L'analisi del tasso di apoptosi, tramite tecnica TUNEL, ha rivelato, invece, un significativo decremento nei topi transgenici rispetto ai controlli (Dentremont et al., 1999; Camarero et al., 2001; Chrysis et al., 2001). L'attività della caspasi-3 è fortemente ridotta nei topi transgenici così come l'espressione dei geni pro-apoptotici Bax e Bad,

mentre l'espressione dei geni anti-apoptotici Bcl-2 aumenta (Baker et al., 1999; Dentremon et al., 1999; Camarero et al., 2001; Chrysis et al., 2001).

Questi dati confermano ulteriormente che IGF-I inibisce l'apoptosi neuronale durante lo sviluppo postnatale precoce del sistema nervoso.

E' interessante notare che studi immunoistochimici su topi knock-out per IGF-I hanno riportato una significativa riduzione dei neuroni parvalbuminergici, in particolare nello striato e nel giro dentato dell'ippocampo (Beck et al., 1995), mentre il numero di neuroni colinergici dello striato e del proencefalo basale ed quello dei neuroni dopaminergici del mesencefalo non varia: questo suggerisce una differente suscettibilità di diverse popolazioni neuronali agli effetti di IGF-I (Beck et al., 1995).

Solo nel giro dentato dell'ippocampo dei topi che sovraesprimono IGF-I si può osservare sia un incremento della proliferazione cellulare che una diminuzione del tasso di apoptosi (O'Kusky et al., 2000): questo studio, unito alle osservazioni diametralmente opposte, effettuate da Ni et al. (1997) nel giro dentato dell'ippocampo di topi transgenici che sovraesprimono IGFBP-1, indica che IGF-I agisce incrementando la proliferazione neuronale ed inibendo l'apoptosi in questa regione cerebrale, in cui la neurogenesi si prolunga fino alla vita adulta.

L'espressione di IGF-I nel cervello dei roditori, tuttavia, ha inizio già durante la vita embrionale (da E14 o prima; Bach et al., 1991); esso è espresso anche nelle cellule staminali neurali del cervello adulto (Brooker et al., 2000). Inoltre, molte regioni del sistema nervoso centrale dei roditori hanno picchi di espressione di IGF-I da E16 a E21 (Bondy, 1991). Tutte queste osservazioni indicano la possibilità di un'azione di IGF-I durante lo sviluppo embrionale del sistema nervoso.

Infatti, un lavoro di recente pubblicazione ha evidenziato che IGF-I ha un importante ruolo nello sviluppo del sistema nervoso anche più precocemente della fase di morte neuronale massiva (Popken et al., 2004): Popken e colleghi hanno creato un topo transgenico che sovraesprime IGF-I già durante la vita prenatale sotto il controllo del promotore della nestina, proteina del citoscheletro, espressa nei progenitori neurali nella maggior parte delle regioni del sistema nervoso centrale (Hockfield e McKay, 1985) ed i cui livelli di espressione declinano però rapidamente una volta che le cellule si differenziano verso un destino neuronale o gliale (Zimmerman et al., 1994; Dahlstrand et al., 1995; Matsuda et al., 1996) ed hanno osservato che in questi topi si osserva un incremento del volume tissutale di molte regioni cerebrali (tra cui

la corteccia, lo striato, l'ippocampo, i gangli della base, il talamo), già significativo durante la vita embrionale (E18) ed ancora più consistente dopo la nascita (P12).

In età embrionale, così come dopo la nascita, la densità cellulare non differisce significativamente tra gli animali transgenici e quelli di controllo, mentre il numero totale di cellule è significativamente superiore nel cervello dei topi transgenici.

L'espressione embrionale di IGF-I in questi topi ha inizio durante la fase proliferativa di neurogenesi dello sviluppo e prima dell'inizio dell'ondata di apoptosi. Marcando le cellule neuroepiteliali in proliferazione delle zone ventricolare e subventricolare degli embrioni E14 con BrdU (5-bromo-2'-deossiridina), è stato osservato che IGF-I accelera la mitosi nei topi transgenici. In relazione, invece, alla marcatura con l'anticorpo contro la caspasi-3, si può apprezzare una significativa riduzione della morte cellulare dei neuroni nella corteccia cerebrale. Tali risultati dimostrano, quindi, che IGF-I promuove lo sviluppo cerebrale sia durante l'embriogenesi che durante la vita postnatale precoce, in un primo tempo stimolando la proliferazione delle cellule neuronali e successivamente inibendo i processi apoptotici (Popken et al., 2004): probabilmente, la stimolazione della proliferazione delle cellule embrionali avviene tramite un meccanismo che coinvolge la riduzione della lunghezza del ciclo cellulare (Popken et al., 2004).

Già precedentemente era stato osservato, infatti, che IGF-I in colture di cellule staminali di muscolo scheletrico riduce la transizione da fase G1 a fase S (Chakravarthy et al., 2000).

Gli effetti in vivo di IGF-I sulle cinetiche del ciclo cellulare sono state analizzate su embrioni di topi transgenici nestina/IGF-I ed è stato osservato che i progenitori neuronali degli animali transgenici hanno un ciclo cellulare più corto del normale: in particolare, è stato rilevato che questo decremento della durata totale del ciclo cellulare è dovuto interamente ad una riduzione della lunghezza della fase G1 (Hodge et al., 2004), che negli animali normali aumenta, invece, con lo sviluppo (Takahashi et al., 1995). Inoltre, nei topi transgenici nestina/IGF-I è significativamente aumentata la proporzione di cellule che rientrano nel ciclo cellulare: IGF-I, dunque, mantiene alta anche la frazione proliferativa (frazione P) di progenitori neurali (Hodge et al., 2004), che normalmente andrebbe diminuendo (Takahashi et al., 1994; Takahashi et al., 1996).

Analisi morfometriche della corteccia cerebrale (in particolare, dell'area somatosenso-

riale) di topi MT-1/IGF-I hanno rivelato, nonostante l'incremento del numero totale dei neuroni, un significativo decremento nella densità dei corpi cellulari (cellule per unità di volume): questa osservazione indica che il volume occupato dai processi neuritici dei neuroni, che separano i singoli corpi cellulari, è notevolmente ampliato ed è perfettamente in linea con gli studi in vitro, precedentemente menzionati, che hanno dimostrato che IGF-I promuove il differenziamento di alcune popolazioni neuronali (Aizeman e DeVellis, 1987; Nataf e Monier, 1992; Fernyhough et al., 1993; Zackenfels et al., 1995; Brooker et al., 2000).

Ad ulteriore conferma, simili analisi morfometriche della corteccia somatosensoriale in topi transgenici IGFBP-1 hanno rivelato un decremento del numero totale di neuroni, a fronte di un incremento della densità dei corpi cellulari (Gutierrez-Ospina et al., 1996): la diminuzione del volume corticale in questi topi transgenici deriva da una riduzione sia del numero dei neuroni che del volume del neuropilo.

Gli effetti della sovraespressione di IGF-I sulla fase di sinaptogenesi sono stati studiati nel nucleo dell'ipoglosso, usando analisi stereologiche tramite microscopia ottica ed elettronica (O'Kusky et al., 2000). Negli animali standard il numero totale di sinapsi aumenta del 354% da P7 a P21, per poi andare incontro ad un significativo decremento fino a P130; nei topi transgenici il numero totale di sinapsi incrementa, invece, del 522% da P7 a P21 per poi ridursi del 28% in età adulta. Il numero totale di sinapsi è significativamente maggiore nei topi transgenici rispetto ai controlli a P21 e a P130 (rispettivamente 42% e 52%). Dal momento che il numero totale dei neuroni del nucleo dell'ipoglosso non differisce significativamente tra topi transgenici e di controllo, il numero di sinapsi per neurone è molto maggiore nei topi transgenici dopo P14.

Questi risultati indicano che l'aumentata espressione in vivo da IGF-I durante lo sviluppo postnatale promuove la fase progressiva della sinaptogenesi, sebbene non prevenga l'eliminazione delle sinapsi durante la fase regressiva.

Anche nel giro dentato dell'ippocampo di topi, che sovraesprimono IGF-I, si osserva un significativo incremento del numero totale delle sinapsi a P14 (61%), P21 (42%), P28 (105%), P35 (96%) e P130 (54%) rispetto ai topi normali (O'Kusky et al., 2000). Studi immunoistochimici su topi knock-out per IGF-I hanno riportato un'anomala espressione di sinaptofisina nell'organo del Corti a P20 (Camarero et al., 2001): l'immunoreattività nei corpi cellulari dei neuroni del ganglio cocleare e delle cellule sen-

soriali ciliate dei topi knock-out a P20 è simile a quello osservato nei controlli a P5, indicando la persistenza di un pattern di distribuzione delle sinapsi immaturo in assenza di IGF-I.

Riepilogando, gli studi in vitro ed in vivo hanno fornito incontestabili evidenze che IGF-I promuove lo sviluppo del sistema nervoso, incrementando il numero dei neuroni, l'elongazione dei processi neuritici e la sinaptogenesi. IGF-I esercita la sua azione sul numero di neuroni, sia incrementando il tasso di proliferazione che inibendo l'apoptosi dei neuroni in due fasi differenti dello sviluppo.

Alcune regioni del sistema nervoso, in particolare il giro dentato dell'ippocampo, sono dipendenti dagli effetti proliferativi di IGF-I anche in fasi successive.

IGF-I e cellule gliali

E' stata ben caratterizzata in diversi lavori un'azione di IGF-I sugli oligodendrociti e sul processo di mielinizzazione. Ci sono, invece, pochi studi su altri tipi di cellule gliali (astrociti, microglia, ecc. ecc.), che sembrano, però, essere influenzate da IGF-I solo in risposta a lesioni (Mason et al., 2000).

La mielinizzazione è strettamente controllata dai neuroni (Chen e DeVries, 1989; Dutly e Schwab, 1991; Barres e Raff, 1993) e da molteplici fattori di crescita ed ormoni (Legrand, 1980; Eccleston e Silberberg, 1985; Van der Pal et al., 1988; Besnard et al., 1989).

Numerose evidenze indicano che IGF-I può avere un ruolo importante in questo processo, promuovendo la proliferazione e la maturazione degli oligodendrociti e stimolando direttamente la mielinizzazione.

Lo studio dei topi transgenici indica, infatti, che la sovraespressione di IGF-I incrementa il numero degli oligodendrociti e dei loro precursori (Ye et al., 1995; Mason et al., 2000; Ye et al., 2000); al contrario, topi mutanti con ridotti livelli di IGF-I hanno un numero minore di oligodendrociti (Beck et al., 1995; Ye et al., 1995; Ni et al., 1997). Studi in vitro indicano similmente che IGF-I promuove la proliferazione dei precursori degli oligodendrociti e la sopravvivenza degli oligodendrociti e dei loro precursori (McMorris et al., 1986; McMorris e Dubois-Dalcq, 1988; van der Paal et al., 1988; McMorris et al., 1993; Ye e D'Ercole, 1999). IGF-I stimola anche la maturazione degli oligodendrociti (Ye et al., 1995; Ye et al., 2000) e ne promuove la sopravvivenza a seguito di lesione (Barres et al., 1993; Mason et al., 2000).

Infine, gli studi sui modelli di topo transgenico hanno dimostrato che IGF-I stimola la sintesi di mielina (Carson et al., 1993; Beck et al., 1995; Ye et al., 1995; Ni et al., 1997; Ye et al., 2000) e promuove il processo di rimielinizzazione a seguito di lesione (Mason et al., 2000; Ye et al., 2000).

Effetti di IGF-I nel sistema nervoso maturo

Mentre il ruolo di IGF-I come mediatore dello sviluppo del sistema nervoso centrale è ormai chiaro, il suo coinvolgimento nelle funzioni del cervello adulto è molto meno conosciuto.

Tuttavia, recenti lavori indicano che IGF-I può avere un ruolo nei processi di plasticità cerebrale. In particolare, IGF-I modula l'efficacia sinaptica, regolando la formazione delle sinapsi, il rilascio di neurotrofine, l'espressione di recettori post-sinaptici e l'eccitabilità neuronale (per una review, vedi Torres-Aleman, 1999).

Infatti, la somministrazione di IGF-I determina una diffusa espressione neuronale di c-fos (Carro et al., 2000), un incremento dell'espressione di BDNF in corteccia ed ippocampo (Carro et al., 2000), una stimolazione della neurogenesi ippocampale (Aberg et al., 2000; Trejo et al., 2001; Anderson et al., 2002), una modulazione dell'espressione dei recettori NMDA del glutammato e del GABA (Ramsey et al., 2004) ed un aumento dell'attività neuronale nei neuroni che accumulano IGF-I (Aberg et al., 2000; Carro et al., 2000).

La modulazione dell'eccitabilità neuronale, in risposta a IGF-I, è stata descritta, ma non è ancora compresa a fondo. IGF-I modula molte conduttanze ioniche (Blair e Marshall, 1997; Kanzaki et al., 1999; Sakagami et al., 1999; Fadool et al., 2000; Kelsch et al., 2001) e l'attività di recettori dei neurotrasmettitori (Wan et al., 1997; Man et al., 2000; Gonzalez de la Vega et al., 2001; Savchenko et al., 2001; Ramsey et al., 2004). L'analisi dei meccanismi cellulari, che sono alla base degli effetti stimolatori di IGF-I sui neuroni dei gangli sensoriali dorsali del midollo spinale, ha indicato che questo fattore trofico modifica le loro proprietà elettrofisiologiche intrinseche e facilita le loro risposte sinaptiche (Nunez et al., 2003).

IGF-I fornisce anche un supporto trofico ai neuroni del sistema nervoso centrale, mantenendone in questo modo la funzionalità (per una review, vedi Torres-Aleman, 2000).

Una diminuzione di questo apporto trofico può determinare la comparsa di gravi patologie del sistema nervoso. Infatti, in molte patologie neurodegenerative, sia nell'uomo che in modelli animali, sono state riscontrate alterazioni dei livelli ematici e cerebrali di IGF-I (Busiguina et al., 2000; Trejo et al., 2004).

Tuttavia, il significato patogenetico delle modificazioni dei livelli di IGF-I deve ancora essere stabilito.

Un'alterazione dei livelli di IGF-I può essere la causa primaria del danno neuronale o svilupparsi secondariamente. Si può supporre che entrambe le possibilità possano aver luogo, a seconda del tipo di patologia. Per esempio, disturbi della sintesi di IGF-I nel fegato, dovuti a danni epatici, diabete o altre condizioni, causano un abbassamento dei livelli di IGF-I, che possono determinare un danno neurologico, come osservato per esempio nell'encefalopatia epatica o nel diabete. Invece, la ridotta sensibilità neuronale a IGF-I, a seguito di infiammazione (Venters et al., 1999), eccitotossicità (Garcia-Galloway et al., 2003) o accumulo extracellulare di amiloide (Jain et al., 1998; Gasparini et al., 2002; Carro e Torres-Aleman, 2004), può contribuire ai processi di morte neuronale.

Si possono, quindi, distinguere casi in cui il blocco di IGF-I è l'origine della disfunzione e della morte neuronale e casi in cui esso contribuisce solo allo svilupparsi della patologia in un secondo tempo. La seconda situazione è forse quella più comune, dal momento che infiammazione ed eccitotossicità sono usualmente associate alla morte neuronale.

Si può concludere, quindi, che l'alterazione del signaling di IGF-I è un tratto comune a molte patologie neurodegenerative.

Determinando il preciso sito di alterazione, potrebbero essere scoperti nuovi bersagli terapeutici potenzialmente utili. Su questa strada è stato recentemente proposto IGF-I come potenziale agente terapeutico delle atassie cerebellari (Fernandez et al., 2005): il trattamento con IGF-I sembra efficace nei modelli animali e i trials preclinici suggeriscono di testare ulteriormente IGF-I, perché potrebbe essere un trattamento che migliora il progredire della patologia.

IGF-I media gli effetti dell'esercizio fisico sul sistema nervoso

L'aforisma latino '*mens sana in corpore sano*' riconosce gli effetti positivi dell'esercizio fisico sulle funzioni cerebrali.

Recenti evidenze, infatti, come abbiamo già menzionato nel paragrafo sull'arricchimento ambientale, associano l'esercizio fisico a diversi indicatori di funzionalità neuronale, come un'incrementata espressione dei fattori neurotrofici, un potenziamento dell'espressione genica e un aumento della neurogenesi ippocampale (Neeper et al., 1995; Gomez-Pinilla et al., 1997; van Praag et al., 1999 a, b).

Tuttavia, i meccanismi, che sono alla base di queste modificazioni, non sono stati identificati per diverso tempo.

Dal momento che è stato dimostrato che, a seguito di esercizio fisico, aumentano i livelli ematici di IGF-I (Schwarz et al., 1996; Wallace et al., 1999), è stato ipotizzato che IGF-I possa modulare la risposta cerebrale all'attività fisica.

Carro et al. (2000) hanno osservato che abbondanti quantità di IGF-I ematico passano nel tessuto cerebrale, attraversando la barriera ematoencefalica, in ratti sottoposti ad esercizio fisico: già dopo un'ora di corsa sulla ruota si può mettere in evidenza, infatti, una diffusa marcatura di differenti aree cerebrali (corteccia, ippocampo, striato, setto, talamo, ipotalamo, cervelletto e molti nuclei del tronco encefalico) con anticorpi contro IGF-I, mentre negli animali di controllo si rileva solo una debole marcatura (Figura 1.8).

La maggior parte delle cellule che accumulano IGF-I sono neuroni, come si può dedurre dalla tipica morfologia e dalla positività di marcatura per la calbindina. Inoltre, l'iniezione intra-carotidea di IGF-I marcato con digossigenina risulta in una marcatura delle stesse aree cerebrali marcate dopo l'esercizio fisico (Carro et al., 2000).

La scoperta più interessante è che la somministrazione di IGF-I mima, almeno in parte, gli effetti dell'esercizio fisico: infatti, l'esercizio fisico e la somministrazione di IGF-I determinano un comune pattern di espressione di c-Fos nel sistema nervoso centrale; inoltre, un incremento simile dell'espressione ippocampale di BDNF è stato trovato sia in animali sottoposti ad esercizio fisico sia negli animali trattati con IGF-I (Carro et al., 2000).

Per determinare se il passaggio di IGF-I dalla barriera ematoencefalica è critico nella mediazione degli effetti dell'esercizio fisico, è stato bloccato l'uptake di IGF-I da parte

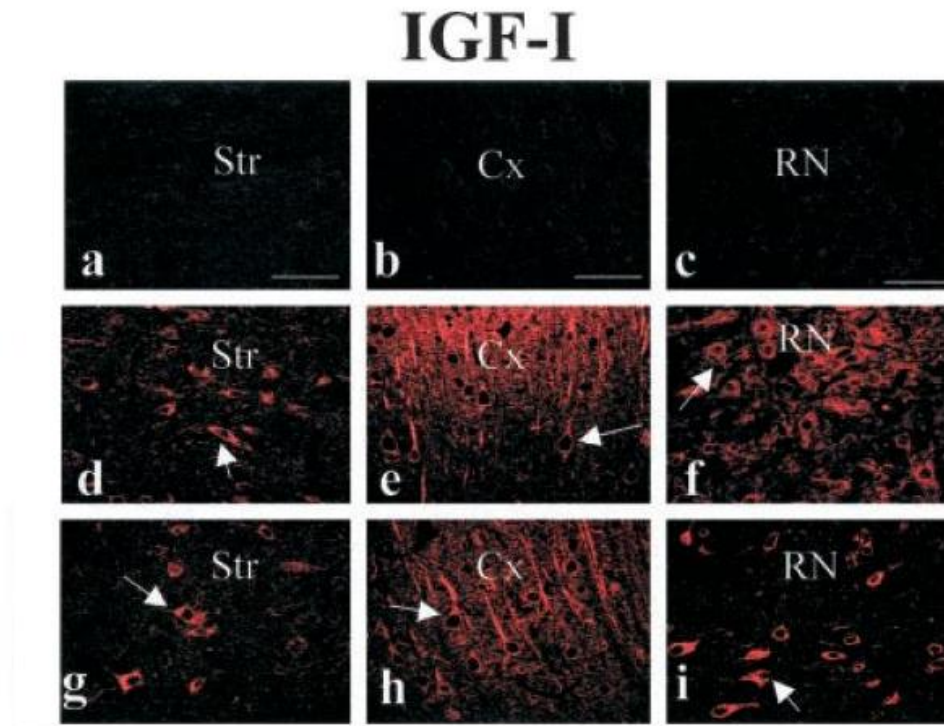


Figura 8: Le stesse aree cerebrali presentano marcatura neuronale di IGF-I in animali sottoposti ad esercizio fisico (a-c) o trattati con IGF-I tramite iniezione intracarotidea (d-f). Negli animali trattati con salina, invece, la marcatura di IGF-I è molto debole (g-i). Sono mostrate tre aree rappresentative. Str: striato; Cx: corteccia cerebrale; RN: nucleo rosso. Barra di calibrazione: $50\mu\text{m}$ *Tratto da Carro et al., 2000*

delle cellule cerebrali prima che gli animali fossero sottoposti al training fisico: la cronica somministrazione nel liquido cerebrospinale di un anticorpo antiIGF-I insieme ad un antagonista del recettore di IGF-I (JB-1) risulta in un blocco del passaggio di IGF-I nel cervello e questa procedura determina anche un blocco dell'attivazione di c-Fos.

Questo lavoro suggerisce un nuovo ruolo fisiologico di IGF-I tramite un meccanismo che prevede il passaggio di IGF-I dal circolo sanguigno al cervello, il suo accumulo in specifici gruppi neuronali, la stimolazione dell'espressione neuronale di c-fos e BDNF e modificazioni a lungo termine dell'attività neuronale.

Studi successivi, effettuati dallo stesso gruppo, hanno dato ulteriore corpo all'evidenza che IGF-I media gli effetti dell'esercizio fisico. Trejo et al. (2001) hanno dimostrato che l'uptake cerebrale di IGF-I ematico media gli effetti stimolanti dell'esercizio fisico sulla neurogenesi ippocampale: infatti, bloccando il passaggio di IGF-I dal circolo sanguigno al cervello in ratti sottoposti ad intenso esercizio fisico, si ottiene una completa inibizione nell'incremento di neuroni ippocampali.

Altre osservazioni che permettono di accomunare le azioni sul sistema nervoso dell'esercizio fisico e dell'IGF-I includono l'aumento delle prestazioni in tests di memoria (Sonntag et al., 1997; Markowska et al., 1998; Radaka et al., 2001), l'incremento dell'angiogenesi (Black et al., 1990; Sonntag et al., 1997) e del consumo cerebrale di glucosio (Cheng et al., 2000; Ide e Secher, 2000).

Inoltre, è stato osservato che l'esercizio fisico incrementa le capacità cognitive di ratti e uomini anziani (Fordyce e Farrar, 1991; Kramer et al., 1999), attenua i deficits motori (Klintsova et al., 1998), migliora il deterioramento neurologico in differenti patologie neurodegenerative (Arkin, 1999; Petajan e White, 1999; Larsen et al., 2000; Mattson et al., 2000), ritarda la morte neuronale correlata all'avanzare dell'età (Larsen et al., 2000).

Carro et al. (2001), partendo dall'osservazione che la somministrazione sistemica di IGF-I, da cui scaturisce un incremento dei livelli cerebrali di IGF-I, ha effetti neuroprotettivi (Fernandez et al., 1998; Fernandez et al., 1999), hanno messo in evidenza che IGF-I media anche gli effetti neuroprotettivi dell'esercizio fisico: infatti, la somministrazione sottocutanea di un anticorpo bloccante IGF-I, che impedisce l'uptake cerebrale di IGF-I, ad animali sottoposti ad esercizio fisico neutralizza gli effetti protettivi dell'esercizio fisico in ogni tipo di modello animale di lesione o patologia

neurodegenerativa studiato.

I meccanismi, tramite i quali IGF-I sarebbe in grado di esercitare tali effetti neuroprotettivi, non sono ancora stati chiariti completamente, ma dovrebbero racchiudere una varietà di processi che supportano un'appropriata funzionalità neuronale, spaziando da quelli che assicurano un'adeguata risposta metabolica a quelli diretti a mantenere la plasticità neurale (Torres-Aleman, 2001). Tuttavia, molti dei meccanismi di neuroprotezione di IGF-I sono stati caratterizzati ed includono la modulazione delle proteine correlate ai fenomeni apoptotici e di neuritogenesi (Fernandez et al., 1999), la modulazione dell'omeostasi del calcio, tramite il mantenimento di livelli appropriati di espressione della calbindina (Nieto-Bona et al., 1995; Lin et al., 2000; Trejo et al., 2001), la modulazione del metabolismo glucidico neuronale (Cheng et al., 2000; Trejo et al., 2001). Si può ipotizzare, però, che ci siano altri processi omeostatici coinvolti nella neuroprotezione mediata da IGF-I, tra cui un aumento dell'angiogenesi ed un'ottimizzazione dello sfruttamento dell'ossigeno da parte dei neuroni (Black et al., 1990; Sonntag et al., 1997; Zelzer et al., 1998; Dunn et al., 2000). Infine, la modulazione di IGF-I dell'eccitabilità neuronale attraverso la modulazione dei canali ionici di membrana, dei recettori del glutammato o delle afferenze sinaptiche (Torres-Aleman, 2001) potrebbe essere altrettanto utile per la neuroprotezione.

Tutte queste osservazioni ci permettono di concludere IGF-I è un importante mediatore delle modificazioni indotte dall'esercizio fisico nel sistema nervoso adulto.